

Biodegradierbare Nanopartikel als Transportsysteme für Wirkstoffe in der Photodynamischen Therapie

In vitro Untersuchungen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.
im Fach Physik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biophys. Annegret Preuß

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Beate Röder
2. Prof. Dr. Marc Schneider
3. Prof. Dr. Mathias O. Senge

eingereicht am: 07.07.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2011

Abstract

In the present study, two novel biodegradable nanoparticle types with a defined size were examined for their suitability as drug delivery systems for use in photodynamic therapy.

Nanoparticulate drug transporters already found a successful application in chemotherapy but the use of biodegradable nanoparticles in the photodynamic therapy is a new promising challenge.

The investigated nanoparticles consist of human serum albumin (HSA) and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and were loaded with the photosensitizers (PS) pheophorbide a (Pheo), meta-tetra(hydroxy-phenyl)-porphyrin (mTHPP) or meta-tetra(hydroxy-phenyl)-chlorin(mTHPC).

The endocytotic intracellular uptake, and the time dependent drug release caused by decomposition of the biodegradable PS loaded nanoparticles were studied *in vitro* on Jurkat cells in suspension. The phototoxicity as well as the intracellular singlet oxygen generation were investigated for different incubation times.

It was shown that both, HSA and PLGA nanoparticles, are promising carriers for PDT agents regarding uptake and phototoxicity. Especially the mTHPC loaded nanoparticles show a very efficient phototoxicity, caused by a very high singlet oxygen generation after the release of the PSs.

The experiments show that the overall intracellular PS concentration is of less importance for the efficiency of the photosensitization compared to the amount of intracellular drug release and the intracellular localisation of the PS molecules. The biodegradability of the HSA and PLGA nanoparticles enables a fast intracellular drug release that causes high phototoxicity even for very low intracellular PS concentrations.

Thus, the strategy for the development of efficient PSs loaded nanoparticulate carriers is not a maximum loading. The main challenge is to create carriers with highly stable PS nanoparticle bonding to prevent any drug release before intracellular uptake combined with the ability of a complete drug release inside the target cells.

Thus, biodegradable polymers are very promising materials for the design of nanoparticulate carrier systems.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neuartige biodegradierbare Nanopartikeltypen mit definierter Größe auf ihre Eignung als Wirkstofftransportsysteme für die Verwendung in der Photodynamischen Therapie untersucht.

Nanopartikuläre Wirkstofftransporter finden in der Medizin bereits vielfältige Anwendung. Jedoch die Verwendung biodegradierbarer Nanopartikel als Wirkstofftransporter in der Photodynamischen Therapie ist ein vielversprechender neuer Ansatz, der im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht wurde.

Die in dieser Arbeit untersuchten Nanopartikel bestehen aus humanem Serumalbumin (HSA), beziehungsweise Polylactid-co-Glycolid (PLGA) und wurden mit den Photosensibilisatoren (PS) Phäophorbid a (Pheo), Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Porphyrin (mTHPP) oder Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Chlorin (mTHPC) beladen.

Es wurde die endozytotische Aufnahme, der lysosomale Abbau der Nanopartikel und die intrazelluläre Freisetzung der PS in Abhängigkeit von der Inkubationszeit *in vitro* an verschiedenen humanen Krebszelllinien untersucht.

Um die Effizienz der Photosensibilisierung durch die mit PS beladenen Nanopartikel zu bestimmen, wurde die Phototoxizität und die intrazelluläre Singulett-Sauerstoffgenerierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl HSA- als auch PLGA-Nanopartikel das Potential besitzen als Wirkstofftransporter in der Photodynamischen Therapie Verwendung zu finden. Insbesondere mTHPC-beladene Nanopartikel wirken durch starke intrazelluläre Singulett-Sauerstoffgenerierung sehr phototoxisch auf die untersuchten Zellen.

Die Experimente zeigen, dass die intrazelluläre PS-Konzentration geringeren Einfluss auf die Effizienz der Photosensibilisierung hat als die intrazelluläre Freisetzung der Photosensibilisatoren sowie deren intrazelluläre Lokalisation.

Die Biodegradierbarkeit von HSA und PLGA ermöglicht einen schnellen Abbau durch die lysosomalen Enzyme. Dadurch kann bereits bei sehr geringen intrazellulären Photosensibilisator-Konzentrationen starke Phototoxizität erreicht werden.

Die beste Strategie bei der Neuentwicklung effizienter nanopartikulärer Photosensibilisator-Transportsysteme ist daher nicht eine möglichst maximale Photosensibilisatorbeladung.

Der Fokus bei der Optimierung sollte einerseits in einer stabilen Verbindung zwischen Photosensibilisator und Nanopartikel liegen, andererseits in einer möglichst effizienten Freisetzung nach der zellulären Aufnahme.

Deshalb sind biodegradierbare Polymere sehr vielversprechende Materialien für die Entwicklung von nanopartikulären Photosensibilisator-Transportsystemen.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Grundlagen	5
1.1 Die Photodynamische Therapie	5
1.1.1 Geschichte der Photodynamischen Therapie	5
1.1.2 Mechanismus der Photodynamischen Therapie	5
1.1.3 Molekulare Grundlagen der Photodynamischen Therapie	8
1.2 Zelltodmechanismen	10
1.2.1 Apoptose	10
1.2.2 Nekrose	12
1.3 Targeting von Krebszellen	13
1.3.1 Passives Targeting von Tumoren - EPR-Effekt	13
1.3.2 Aktives Targeting von Tumoren - Antikörper	15
1.4 Nanopartikel als Wirkstofftransporter	15
1.4.1 Anorganische Nanopartikel	16
1.4.2 Biodegradierbare Nanopartikel	16
2 Material	19
2.1 Zellmodelle	19
2.1.1 Jurkatzellen	19
2.1.2 HT29-Zellen	19
2.2 Arbeitsmaterial	20
3 Methoden	23
3.1 Spektroskopische Messaufbauten und Messverfahren	23
3.1.1 Stationäre Fluoreszenzspektroskopie	23
3.1.2 Laserflashphotolyse	24
3.1.3 Zeitaufgelöste Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz-Detektion	25
3.2 Handhabung der Zellkulturen	26
3.2.1 Kultivierung von Jurkat- und HT29-Zellen	26
3.2.2 Inkubation zur Photosensibilisierung der Jurkatzellen und HT29-Zellen	27
3.3 <i>In vitro</i> Untersuchungen	28
3.3.1 Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme der Photosensibilisatoren	28
3.3.2 Endozytosenachweis mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie	28

3.3.3	Nachweis der intrazellulären Photosensibilisator-Freisetzung mittels Fluorescence Lifetime Imaging	29
3.3.4	Bestimmung der Phototoxizität und Dunkeltoxizität	30
4	Photosensibilisatoren und Nanopartikel	35
4.1	Untersuchte Photosensibilisatoren	35
4.1.1	Phäophorbid a (Pheo)	35
4.1.2	Meta-tetra(hydroxy-phenyl)-porphyrin (mTHPP)	37
4.1.3	Meta-tetra(hydroxy-phenyl)-chlorin (mTHPC)	37
4.1.4	<i>In vitro</i> Voruntersuchungen an den verwendeten Photosensibilisatoren	38
4.2	Untersuchte Nanopartikel	43
4.2.1	mTHPC-, mTHPP- und Pheo-beladene HSA-Nanopartikel	43
4.2.2	mTHPP- und mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel	43
5	Entwicklung eines Routineverfahrens	47
5.1	Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mittels Nanopartikeln transportierten Photosensibilisatoren	47
5.1.1	Intrazelluläre Aufnahme von mit Pheo beladenen HSA-Nanopartikeln	48
5.2	Nachweis der endozytotischen Aufnahme	49
5.2.1	Endozytotische Aufnahme von mit Pheo beladenen HSA-Nanopartikeln, Nachweis mittels Konfokaler Laserscanningmikroskopie	49
5.3	Nachweis des lysosomalen Abbaus der Nanopartikel	50
5.3.1	Lysosomaler Abbau der Pheo-HSA Nanopartikel und intrazelluläre Freisetzung von Pheo, Nachweis mittels Fluoreszenz Lifetime Imaging	50
5.4	Überprüfung der Photo- und Dunkeltoxizität	52
5.4.1	Phototoxizität und Dunkeltoxizität von mit Pheo beladenen HSA-Nanopartikeln	53
5.5	Zusammenfassung der Untersuchungen an Pheo-beladenen HSA-Nanopartikeln	56
6	HSA-Nanopartikel als Transportsysteme	59
6.1	Bestimmung des optimalen PS-HSA-Nanopartikelsystems	59
6.1.1	Präparation der Nanopartikel	59
6.1.2	Vernetzungsgrad der HSA-Monomere in den Nanopartikeln	62
6.1.3	PS-Beladungsrate der HSA-Nanopartikel	66
6.1.4	Endozytotische Aufnahme der mit mTHPP und mTHPC beladenen HSA Nanopartikel und intrazelluläre Freisetzung der Photosensibilisatoren	67
6.2	Diskussion - photodynamische Wirksamkeit photoaktiver HSA-Nanopartikel	76
6.2.1	Einfluss der Photosensibilisatoren auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver HSA-Nanopartikel	77
6.2.2	Einfluss der Quervernetzung der HSA-Monomere auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver HSA-Nanopartikel	80

6.2.3	Einfluss der Photosensibilisatorbeladungsrate auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver HSA-Nanopartikel	81
6.2.4	Stabilität der photoaktiven HSA-Nanopartikel	81
7	PLGA-Nanopartikel als Transportsysteme	83
7.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen an mit mTHPP beladenen PLGA-Nanopartikeln	83
7.1.1	Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPP-PLGA-Nanopartikeln	83
7.1.2	Endozytotische Aufnahme mTHPP-beladener PLGA-Nanopartikel -Nachweis mittels CLSM	84
7.1.3	Lysosomaler Abbau der mTHPP-beladenen PLGA-Nanopartikel und Freisetzung des mTHPP -Nachweis mittels FLIM	85
7.1.4	Dunkeltoxizität und Phototoxizität von mTHPP beladenen PLGA-Nanopartikeln	86
7.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen	89
7.2.1	Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPC-PLGA-Nanopartikeln mit unterschiedlichen Beladungsstrategien	89
7.2.2	Dunkeltoxizität und Phototoxizität von mTHPC beladenen PLGA-Nanopartikeln mit verschiedenen Beladungsstrategien	91
7.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen	93
7.3.1	Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von unterschiedlich modifizierten mTHPC-PLGA-Nanopartikeln	93
7.3.2	Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von unterschiedlich modifizierten mTHPC-PLGA-Nanopartikeln in HT29-Zellen	95
7.3.3	Endozytotische Aufnahme mTHPC-beladener PLGA-Nanopartikel -Nachweis mittels CLSM	96
7.3.4	Endozytotische Aufnahme mTHPC-beladener, Immunglobulin G-modifizierter PLGA-Nanopartikel -Nachweis mittels CLSM	98
7.3.5	Endozytotische Aufnahme mTHPC-beladener, Erbitux modifizierter PLGA-Nanopartikel -Nachweis mittels CLSM	98
7.3.6	Lysosomaler Abbau der mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikel und Freisetzung des mTHPC -Nachweis mittels FLIM	101
7.3.7	Dunkeltoxizität und Phototoxizität von unterschiedlich modifizierten mTHPC beladenen PLGA-Nanopartikeln	101
7.3.8	Phototoxizität modifizierter mTHPC-PLGA-Nanopartikel in HT29-Zellen -Apoptosenachweis mittels Caspase 3/7-Assay	104
7.4	Diskussion der photodynamischen Wirksamkeit photoaktiver PLGA-Nanopartikel	107
7.4.1	Einfluss von mTHPP und mTHPC auf die photodynamische Wirksamkeit von PLGA-Nanopartikeln	107
7.4.2	Einfluss der Beladungsrate und der Beladungsstrategie auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver PLGA-Nanopartikel .	109
7.4.3	Einfluss der Antikörper-Modifizierung und der PEGulierung auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver PLGA-Nanopartikel	110

7.4.4	Stabilität der photoaktiven PLGA-Nanopartikel	111
8	Diskussion	113
8.1	Tabellarische Zusammenfassung	113
8.2	Intrazelluläre Photosensibilisatorkonzentration - Viel hilft viel?	113
8.3	Targeting von Gewebetumoren - sind Antikörper nötig?	114
8.4	Intrazelluläre Freisetzung der Photosensibilisatoren	114
8.5	Schlussfolgerung und Ausblick	115
Anhang		119
1	Photophysikalische Charakterisierung der photoaktiven HSA-Nanopartikel	119
2	Photophysikalische Charakterisierung der photoaktiven PLGA-Nanopartikel	124
Abkürzungen		129

Einleitung

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine alternative Methode zur Behandlung von Tumoren und anderem krankhaft verändertem Gewebe. Die Wirkstoffe der PDT, die so genannten Photosensibilisatoren (PS), sind biochemisch inerte Moleküle, welche ihre Wirkung erst in Zusammenarbeit mit Licht des sichtbaren Spektrums und molekularem Sauerstoff entfalten. Ohne Bestrahlung sind die PS inaktiv (siehe Abschnitt 1.1). Die Anreicherung von PS führt zur Photosensibilisierung, und die nachfolgende Bestrahlung zum Absterben des betreffenden Gewebes.

Für diese Form der Therapie werden Energietransferprozesse zwischen den PS-Molekülen und dem im Zielgewebe vorhandenen molekularen Sauerstoff genutzt, welche durch Stoßwechselwirkungen ausgelöst werden (siehe Unterabschnitt 1.1.3).

Der dabei generierte, hochreaktive Singulett-Sauerstoff (1O_2) ist in der Lage, zelluläre Strukturen direkt oder indirekt zu schädigen. Im Idealfall werden dabei Zelltodmechanismen im Zielgewebe ausgelöst (siehe Abschnitt 1.2).

Der 1O_2 wird ausschließlich während der Bestrahlung des photosensibilisierten Gewebes generiert. Daher kann die Dosis der Behandlung über die Bestrahlungsintensität und -dauer kontrolliert werden.

Dies und die Verwendung von Licht des sichtbaren Spektralbereichs kann zur Verminderung von Nebenwirkungen beitragen. Diese Form der Bestrahlung hat keine toxische Wirkung auf nicht photosensibilisiertes Gewebe (siehe Abbildung 1.1). Somit wird das umliegende, gesunde Gewebe deutlich weniger belastet als beispielsweise in der herkömmlichen Strahlentherapie, bei welcher hochenergetische Gammastrahlen verwendet werden.

Um diesen Vorteil nutzen zu können, muss jedoch gewährleistet werden, dass ausschließlich das zu behandelnde, krankhafte Gewebe photosensibilisiert wird. An dieser Stelle besteht aktuell der größte Forschungsbedarf.

Bisher müssen Patienten in der PDT ausserhalb der eigentlichen Behandlung für einen längeren Zeitraum vor Licht geschützt werden. Sie müssen sich in fensterlosen Räumen, welche mit speziellem ungefährlichem Gelblicht beleuchtet werden, aufhalten. Dies bedeutet für die oft durch schwere Krankheit geschwächten Patienten eine zusätzliche psychische Belastung.

Deshalb wird an Wirkstoffträgersystemen geforscht, die eine gezielte Anreicherung der PS im zu behandelnden Gewebe ermöglichen sollen. Durch eine selektive Anreicherung kann ausserdem die zur Behandlung benötigte Dosis an PS reduziert werden. Die selektive Anreicherung von Wirkstoffen in definiertem Gewebe wird Targeting genannt. Verschiedene Targetingstrategien unterteilen sich in passives und aktives Targeting.

Passives Targeting bezeichnet Strategien zur Anreicherung von Wirkstoffen in Tumorgewebe ohne Aktivierung zellspezifischer, membranständiger Rezeptoren. Aktives Targeting

wird durch die Bindung des Wirkstoffes an bestimmte Biomoleküle, wie Antikörper (AK) erreicht, welche spezifisch an bestimmte Oberflächenrezeptoren der Zielzellen binden.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Wirkstofftransportern, welche über den so genannten *enhanced permeability and retention* (EPR)-Effekt passives Targeting ermöglichen sollen (siehe Abschnitt 1.4).

Diese Transporter sollen eine systemische Verabreichung der PS ermöglichen. Nach der Injektion der PS-beladenen Nanopartikel (NP) gelangen diese über die Blutbahn bis in das zu behandelnde Tumorgewebe und reichern sich dort an.

NP als Wirkstofftransporter finden bereits in vielen Gebieten der Medizin Anwendung. Die in dieser Arbeit untersuchte mögliche Verwendung von NP als Wirkstofftransporter in der PDT ist jedoch neu und wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht.

Alle in dieser Arbeit *in vitro* an humanen Krebszelllinien untersuchten NP sind biodegradierbar. Untersucht wurde die Effizienz der Photosensibilisierung von Zellen durch an NP gebundene PS.

Die erzielten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass NP als Wirkstofftransporter in der PDT besonders gut geeignet sind. Ein besonderer Vorteil ist die Biodegradierbarkeit der hier untersuchten NP.

Wechselwirkungen der PS-Moleküle untereinander und mit den NP verhindern eine effiziente 1O_2 -Generierung. Erst die Biodegradierbarkeit ermöglicht, durch den intrazellulären Abbau der NP, eine Freisetzung der PS in den Zielzellen und damit eine Aktivierung der PS am Wirkungsort.

Mit Hilfe von konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM)- und *Fluorescence Lifetime Imaging* (FLIM)-Untersuchungen konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass die Freisetzung der PS und damit auch ihre phototoxische Wirkung abhängig ist von der Beladung der NP. Als Resultat zeigt sich die Möglichkeit einer Verringerung der nötigen PS-Konzentration.

Ein Teil der hier untersuchten NP wurden zusätzlich für ein aktives Targeting PEGuliert (Polyethylenglykol (PEG)) und mit AK modifiziert.

Zur Vermeidung von Nebenwirkungen sollen die PS ihre phototoxische Wirkung erst nach der Aufnahme der NP in die Zielzellen entfalten können. Deshalb ist die Biodegradierbarkeit der NP von besonderem Interesse.

Die NP sollen von den Zielzellen als potentielle Nahrung durch Endozytose aufgenommen und intrazellulär durch Verdauungsprozesse abgebaut werden. Der Abbau der NP nach der intrazellulären Aufnahme ermöglicht eine Freisetzung der PS im Zytoplasma der Zellen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Deutsch-Chinesischen Verbundprojektes *NanoCancer* angefertigt.

Es wurden zwei verschiedene Typen von biodegradierbaren NP untersucht, welche innerhalb des Verbundprojektes entwickelt wurden. Die aus dem Polymer Polylactid-co-Glycolid (PLGA) synthetisierten NP wurden von Thomas Knobloch an der Goethe-Universität, Frankfurt am Main, synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Die aus humanem Serumalbumin (HSA) synthetisierten NP wurden von Matthias Wacker [220] (Goethe-Universität, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt.

Die Entwicklung der Synthesen beider NP-Typen wurde von Prof. Dr. Langer (Westfälische Wilhelms Universität, Münster) betreut.

Ebenfalls innerhalb des Verbundprojektes wurden diese NP von Kuan Chen im Rahmen einer Promotion photophysikalisch untersucht [36].

Um die Effizienz der Photosensibilisierung durch die PS-NP-Systeme zu untersuchen, wurde neben dem Einfluss der Beschaffenheit der NP auch der Einfluss der PS auf die Eignung der NP als Transporter betrachtet.

Die drei in dieser Arbeit untersuchten PS sind Phäophorbid a (Pheo), Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Porphyrin (mTHPP) und Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Chlorin (mTHPC) (siehe Abschnitt 4.1).

Die effiziente Photosensibilisierung ist eine wichtige zu untersuchende Eigenschaft der PS-NP-Systeme, jedoch nicht die einzige. Um unerwünschte Nebenwirkungen auszuschließen, dürfen die PS-NP-Systeme ohne Bestrahlung keinen Einfluss auf biologische Prozesse ausüben. Dies wurde durch Dunkeltoxizitätstests untersucht.

1 Grundlagen

1.1 Die Photodynamische Therapie

1.1.1 Geschichte der Photodynamischen Therapie

Heilende und zerstörende Effekte von Licht, vermittelt durch photosensibilisierende Substanzen sind seit Jahrtausenden bekannt. Ein zunehmend ernst zu nehmendes wissenschaftliches Interesse an solchen Phänomenen besteht jedoch erst seit 1900, nach den ersten Beobachtungen von Oscar Raab und Hermann von Tappenheimer, welche die Wirkung von Acridin und Licht auf Paramecien untersuchten [163]. Bereits 4 Jahre später brachte Tappenheimer diese Effekte mit dem Vorhandensein von Sauerstoff in Zusammenhang und prägte den Begriff *photodynamische Wirkung* [207].

1913 zeigte Meyer-Betz anhand eines eindrucksvollen Selbstexperimentes die photodynamische Wirkung beim Menschen [134].

Anfang der Vierziger Jahre beschrieb Harold F. Blum die Wirkung photodynamischer Effekte auf humanes Gewebe [28]. Von Auler wurde erstmals die Lokalisierung von Porphyrinen in Tumoren beschrieben [15]. Die Verwendung von Tumor-lokalisierten PS zur Diagnostik durch Detektion der Fluoreszenz wurde 1955 von Schwartz et. al. publiziert [190].

Dougherty führte 1975 die erste erfolgreiche PDT an Mäusen mit Brustkrebs [48] und später 1978 auch an Menschen, die an Hauttumoren litten [46] durch.

1984 wurde der erste PS, der Dihämatoporphyrinether, besser bekannt unter dem Namen Photofrin, von der *American Food and Drug Administration* als Medikament zugelassen.

Seither wurden viele neue PS entwickelt. Es handelt sich häufig um Porphyrine, Porphyrinderivate und Chlorine [30], wie beispielsweise das in dieser Arbeit verwendete PS Pheo [168].

Ein Schwerpunkt der aktuellen PDT-Forschung ist das Targeting von Tumorzellen [76]. Von besonderem Interesse sind hierbei biodegradierbare Wirkstofftransportsysteme [21, 136, 149], wie sie auch in dieser Arbeit untersucht werden.

Neben der Behandlung von Tumoren und anderen krankhaften Veränderungen beschäftigt sich die aktuelle Forschung auch mit der Nutzung der photodynamischen Wirkung auf Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Viren [34, 70, 75, 91, 92, 128–130]. Hierbei ist die Bekämpfung pathogener Antibiotika-resistenter Bakterien von besonderem Interesse.

1.1.2 Mechanismus der Photodynamischen Therapie

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine alternative Methode zur Behandlung von Tumoren und anderen Erkrankungen [28, 135, 159, 167, 177].

1 Grundlagen

Die Therapie von Krebserkrankungen war einer der ersten Schwerpunkte in der Anwendung der PDT. Besonders die Behandlung von Tumoren die ohne schweren operativen Eingriff von außen oder endoskopisch mit einer Lichtquelle erreichbar sind, wie Kopf- und Halstumore [26], Lungentumore [94], Speiseröhrenkrebs [87], Blasenkrebs [198] und vor allem Hautkrebserkrankungen [168,175], ist eintypisches Ziel der PDT.

Im Gegensatz zu anderen Therapieformen werden in der PDT keine biochemisch aktiven Wirkstoffe verwendet. Es werden Energietransferprozesse photoaktiver Substanzen, so genannter Photosensibilisatoren (PS) genutzt, um im Zielgewebe aus molekularem Sauerstoff Singulett-Sauerstoff (1O_2) zu generieren, welcher aufgrund seiner hohen Reaktivität direkt oder indirekt toxisch wirkt [28,72,135,150,152,159,164,177,179,213].

Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Reaktion erst durch Lichteinwirkung initiiert wird. Die PS sollten nicht toxisch wirken, solange sie nicht bestrahlt werden [35,177].

Als PS werden Farbstoffe genutzt, die Licht im langwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums absorbieren. In diesem Wellenlängenbereich kommt es kaum zur Eigenabsorption des Gewebes, daher können lichtinduzierte Nebenwirkungen minimiert werden [27,72]. Die Eindringtiefe von Licht in menschliches Gewebe ist von der verwendeten Wellenlänge abhängig [45,182], limitierend ist hier insbesondere die Absorption von Wasser [20], Hämoglobin und Melanin [137,159,226].

Der Wellenlängenbereich zwischen 650 nm bis 800 nm, das so genannte *diagnostische Fenster* (siehe Abbildung 1.1), zeichnet sich durch besonders geringe Eigenabsorption des Gewebes aus, deshalb werden als PS bevorzugt Moleküle verwendet die in diesem Bereich gut absorbieren [55].

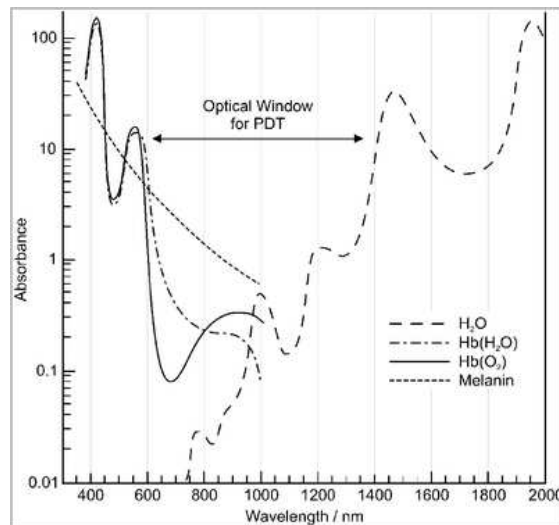


Abbildung 1.1: Diagnostisches Fenster - Absorptionsspektren der häufigsten Pigmente in humanem Gewebe. (aus [159]).

PS werden chemisch nicht verbraucht, sondern wirken wie Katalysatoren [16,17,56,57,82,177,202]. Über die Bestrahlungsdauer lässt sich daher die auf die Zellen wirkende 1O_2 -Dosis regulieren.

1.1 Die Photodynamische Therapie

Die zerstörende Wirkung des 1O_2 beschränkt sich auf seine unmittelbare Umgebung. Für die meisten PS sind das vor allem intrazelluläre Membranstrukturen [30] wie Mitochondrien, Golgi-Apparat, Lysosomen, Endosomen und endoplasmatisches Retikulum (ER) [31].

Die Schädigung dieser Membranstrukturen löst im Idealfall den Zelltod der betroffenen Zellen aus (siehe Abschnitt 1.2).

1.1.3 Molekulare Grundlagen der Photodynamischen Therapie

Photodynamische Effekte werden in drei verschiedene Kategorien eingeteilt [115].

Typ I der Photosensibilisierung beschreibt Reaktionen bei welchen PS im angeregten Triplettzustand (siehe Abbildung 1.2) mit benachbarten Molekülen reagieren [57]. Dabei entstehen Radikale, vor allem radikalischer Sauerstoff, welcher aufgrund seiner hohen Reaktivität toxisch wirkt.

Die **Typ II** Reaktion beschreibt den Energie Transfer-Prozess zwischen PS und molekularem Sauerstoff, in dessen Folge hochtoxischer 1O_2 generiert wird [57, 141] (siehe Abbildung 1.2).

Typ III der Photosensibilisierung fasst alle Prozesse zusammen, bei denen ohne Beteiligung von Sauerstoff, durch photoinduzierten Elektronentransfer vom PS auf benachbarte Moleküle toxische Radikale gebildet werden [115].

Die **Typ I**- und die **Typ II**-Prozesse laufen in Konkurrenz zueinander ab. Die wichtigste Rolle spielt unter physiologischen Bedingungen der **Typ II**-Prozess [57, 141], deshalb wird dieser im Folgenden genauer vorgestellt. Ein Energieschema welches die für die Wechselwirkungen zwischen PS und Sauerstoff relevanten Prozesse beschreibt, das *Jablonski-Diagramm*, ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

Durch Absorption eines Lichtquants geht der PS in einen elektronisch angeregten Zustand, den ersten angeregten Singulettzustand S_1 oder höher angeregte Zustände S_n über. Aus diesem Zustand relaxiert das Molekül strahlungslos durch Innere Umwandlung (= *Internal Conversion* (IC)) in den Schwingungsgrundzustand von S_1 . Aus diesem Zustand gibt es verschiedene Möglichkeiten der Relaxation.

Im einfachsten Fall gibt das PS-Molekül ein Lichtquant ab und relaxiert dabei zurück in den S_0 -Zustand. Diesen Prozess nennt man Fluoreszenz. Auch eine weitere Relaxation über strahlungslose Prozesse (IC) in den S_0 -Zustand ist möglich.

Interkombination (*Inter System Crossing* (ISC)) beschreibt einen Prozess, bei welchem unter Spinumkehr des entsprechenden Valenzelektrons, das Molekül beispielsweise vom S_1 -Zustand in den ersten angeregten Triplettzustand T_1 wechselt.

Vom T_1 -Zustand kann das Molekül nun ebenfalls durch Abgabe eines Lichtquants (Phosphoreszenz) oder durch strahlungslose Prozesse (IC) in den S_0 -Zustand relaxieren.

Ein PS-Molekül im T_1 -Zustand kann jedoch auch durch Stoßwechselwirkungen seine Energie mittels ISC an molekularen Sauerstoff abgeben. Dabei relaxiert der PS zurück in den S_0 -Zustand, das Sauerstoffmolekül, dessen Grundzustand der Triplettzustand T_0 ist, wird dabei in den ersten angeregten S_1 -Zustand versetzt. Dieser angeregte Sauerstoff wird Singulett-Sauerstoff (1O_2) genannt und ist hoch reaktiv.

Die hohe Reaktivität führt in biologischer Umgebung dazu, dass der 1O_2 schnell durch Reaktionen mit Biomolekülen chemisch verbraucht wird. Nicht verbrauchter 1O_2 kann durch Phosphoreszenz oder IC in den T_0 -Zustand zurückfallen.

Die Prozesse der Photosensibilisierung und 1O_2 -Generierung wurden in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben, beispielsweise in [56, 57, 61, 82, 159, 178, 224].

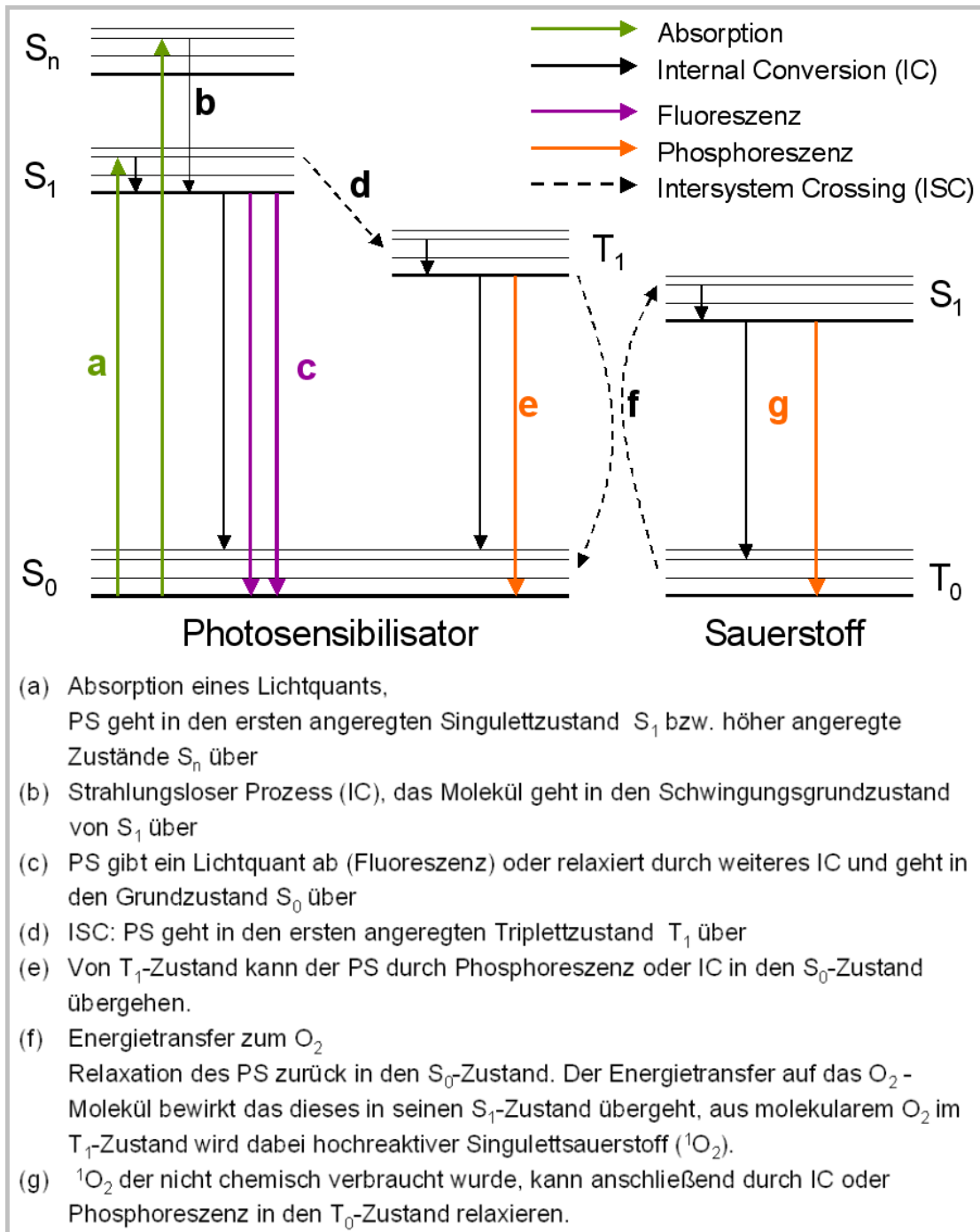


Abbildung 1.2: Jablonski-Diagramm für das System PS/Sauerstoff.

1.2 Zelltodmechanismen

Ziel der photodynamischen Behandlung ist der Zelltod der Zielzellen.

Die zwei wichtigsten Zelltodmechanismen eukaryotischer Zellen sind die Apoptose und die Nekrose. Die physiologischen Auswirkungen auf den betroffenen Organismus sind je nach Zelltodmechanismus sehr verschieden. Beide Mechanismen sind schematisch in Abbildung 1.3 dargestellt und werden in den folgenden beiden Abschnitten 1.2.2 und 1.2.1 beschrieben.

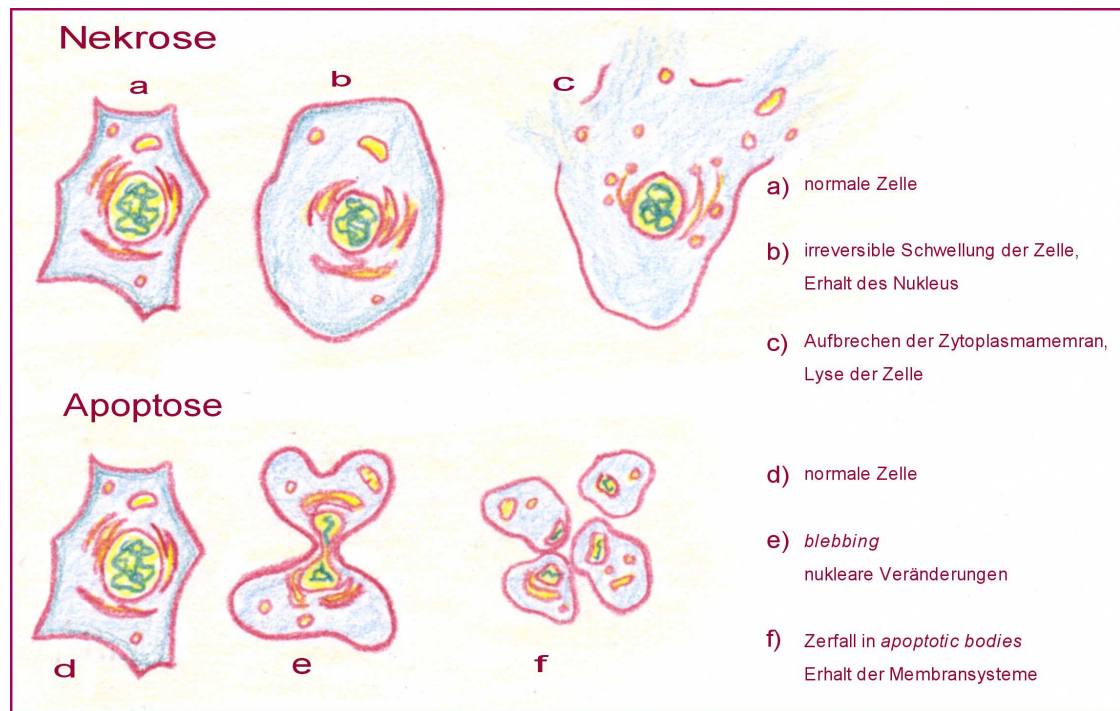


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Ablaufs der Zelltodmechanismen Apoptose und Nekrose

1.2.1 Apoptose

1991 wurde von Agarwal et. al. in Maus-Lymphomazellen nachgewiesen, dass die photodynamische Behandlung vorrangig zur Apoptose führt [6].

Die Apoptose ist eine Reaktion auf verschiedene intrazelluläre Signalwege, welche auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird [119,189]. Sie ist eins der wichtigsten biologischen Phänomene und spielt eine essentielle Rolle in der Wachstumskinetik von biologischem Gewebe [25,95]. Erst ein Gleichgewicht von Wachstum und Apoptose des Gewebes ermöglicht lebens- und funktionsfähige Organe.

Die Apoptose ist ein hochregulierter Prozess, der in allen eukaryotischen Zelltypen vorkommt. Apoptosemechanismen können sowohl zu einem genetisch festgelegten Zeit-

punkt [86], als auch durch die Beschädigung bestimmter Zellbestandteile ausgelöst werden. Eine besondere Rolle spielt hierbei die Schädigung von Mitochondrien unter Verlust des mitochondrialen Membranpotentials [96, 110, 205].

Auch die Schädigung anderer Organellen, beispielsweise der Lysosomen, kann Apoptose auslösend sein [25, 97, 160].

Die Schlüsselenzyme der Apoptose, welche den „Selbstabbau“ der Zellen regulieren sind die Caspasen¹ [25, 210, 218, 230].

Während der Initiationsphase werden durch ein proapoptotisches Signal die so genannten Initiatorcaspasen aktiviert [192]. Diese haben die Aufgabe, das Zelltodprogramm zu regulieren, indem sie Effektorcaspasen aktivieren [192, 193].

Die Zelle geht nun in die Exekutionsphase. In dieser Phase der Apoptose katalysieren die Effektorcaspasen den Abbau der Zelle [193]. Zu den Effektorcaspasen gehören beispielsweise die Caspasen 3 und 7. Der Nachweis der Aktivität dieser beiden Effektorcaspasen kann als biochemischer Apoptosenachweis genutzt werden (siehe Unterunterabschnitt 3.3.4.3).

Während der Exekutionsphase kommt es zur Zellschrumpfung und zur Umverteilung von Phosphatidylserin von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Zytoplasmamembran. Auch der Zellkern verändert sich in dieser Phase der Apoptose, es kommt zur Kernfragmentierung und zur Kondensation des Chromatin mit anschließendem Abbau der DNA [67]. Die Kondensation des Chromatins kann mittels Fluoreszenzmikroskopie als Apoptosenachweis genutzt werden.

Während des apoptotischen Abbaus der Zelle werden zelluläre Bestandteile sortiert und in Vesikel verpackt, dabei zerfällt die Zelle in einzelne membranumschlossene Kompartimente, die so genannten *Apoptotic Bodies*. Diesen Vorgang nennt man apoptotisches *Blebbing* [25, 83, 142]. Die Membranintegrität der Zelle bleibt während des gesamten Prozesses erhalten [230]. Das apoptotische *Blebbing* lässt sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Jurkatzellen leicht lichtmikroskopisch nachweisen und kann somit ebenfalls für den Apoptosenachweis genutzt werden (siehe Unterunterabschnitt 3.3.4.2).

In der letzten Phase der Apoptose, der Terminationsphase werden die *Apoptotic Bodies* durch Zellen des umliegenden Gewebes oder durch Makrophagen des Immunsystems phagozytiert, dabei werden die in der Exekutionsphase durch Umverteilung an die Oberfläche der Zytoplasmamembran gelangten Phosphatidylserine durch Phosphatidylserinspezifische Rezeptoren erkannt. Diese Rezeptoren leiten den Signalweg der Phagozytose ein. Nach der Phagozytose werden die *Apoptotic Bodies* durch lysosomale Enzyme abgebaut [52, 107, 186]. Dieser Prozess verhindert eine Entzündungsreaktion des Gewebes [219]. Deshalb ist Apoptose der präferierte Weg des Zelltods bei der Tumorbehandlung.

In Abbildung 1.4 ist eine schematische Darstellung der Signalwege von der Apoptose und der Nekrose welche über die Schädigung von Mitochondrien ausgelöst werden, zu sehen.

¹CysteinyI **A**Spartat-spezifische **P**rotein**A**SEN

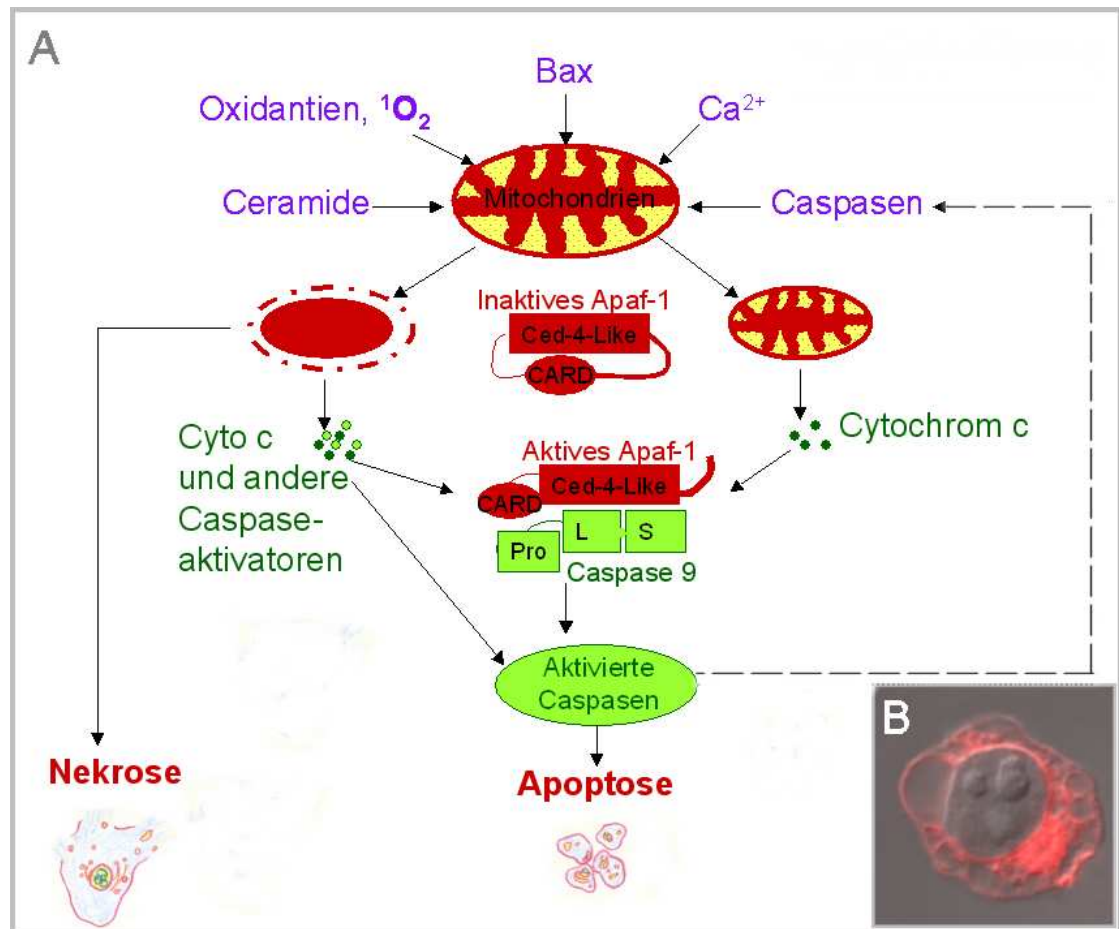


Abbildung 1.4: (A) Über geschädigte Mitochondrien ausgelöste Zelltodsignalwege, Zelltod auslösende Faktoren sind in blau dargestellt (verändert nach [67]), (B) Apoptotische Jurkatzelle nach Photosensibilisierung mit Pheo (rot = Pheo-Fluoreszenz)

1.2.2 Nekrose

Die Nekrose wird hauptsächlich durch extrazelluläre Einflüsse ausgelöst, beispielsweise durch Ultraviolette Strahlung (UV), chemischen Stress oder Infektionen. Die Zelle schwillt dabei stark an, bis die Zytoplasmamembran dem Druck nicht mehr standhalten kann und die Zelle platzt [222]. Aufgrund der Beschädigung der Zytoplasmamembran können intrazelluläre Bestandteile ungehindert in das umliegende Gewebe eindringen, dadurch kommt es zu Entzündungsreaktionen [64, 110]. Überreste nekrotischer Zellen werden im Organismus von Makrophagen abgebaut [64].

Die Entscheidung, ob eine Zelle in Nekrose oder Apoptose verfällt richtet sich nach der Schwere und der Art der Schädigung, und vor allem nach den vorhandenen Energiereserven und damit dem Adenosintriphosphat (ATP)-Spiegel der Zelle. Nekrose findet in Zellen mit sehr geringem ATP-Spiegel statt [140].

Die durch Nekrose ausgelösten Entzündungsreaktionen stellen bei der Tumorthera- pie schwer kranker Patienten ein lebensbedrohliches Problem dar, deshalb sollte die Nekroserate im Tumorgewebe möglichst gering gehalten werden.

In vitro Untersuchungen von Reiter et al. an Makrophagen in Verbindung mit künstlich in Nekrose oder Apoptose versetzten Tumorzellen legen jedoch nahe, dass ein Anteil an Nekrose im behandelten Tumorgewebe für eine erfolgreiche Therapie nötig ist [174]. Die Untersuchungen zeigen, dass in einem Verband nekrotischer Zellen auch lebende Zellen von Makrophagen entsorgt werden. In apoptotischem Zellverband werden nur die toten Zellen durch Makrophagen phagozytiert, übrig gebliebene lebende Tumorzellen können sich anschließend ungehindert weiter vermehren.

Eine Therapie, die nicht 100% des Tumorgewebes abtötet, führt zu einer Selektion besonders widerstandsfähiger Tumorzellen.

Eine effiziente PDT ist daher erst durch ein Auslösen von Apoptose und Nekrose im Zielgewebe möglich.

1.3 Targeting von Krebszellen

Ein zentrales Problem der aktuellen PDT-Forschung ist das Targeting von Tumorzellen [10, 35, 53, 72, 93, 104, 127, 227], mit dieser Aufgabe beschäftigt sich auch die vorliegende Arbeit.

Erst eine spezifische Anreicherung der PS in den Zellen des zu behandelnden Gewebes ermöglicht eine nebenwirkungsarme Therapie. Die Kopplung der PS an Transportsysteme ermöglicht die Anreicherung im Zielgewebe [72, 123, 127] (siehe auch: Unterabschnitt 1.3.1) und damit eine weitere Minimierung von Nebenwirkungen.

1.3.1 Passives Targeting von Tumoren - EPR-Effekt

Passives Targeting bezeichnet Strategien zur Anreicherung von Wirkstoffen in Tumorge- webe ohne Aktivierung zellspezifischer, membranständiger Rezeptoren. Es werden keine AK oder spezifische Zuckerketten benötigt. Die Spezifität wird allein durch die Größe der Wirkstofftransporter erreicht [10, 50, 123, 125–127, 206, 211].

Der Begriff EPR-Effekt wurde von Matsumura und Maeda 1986 [133] geprägt. Er beschreibt die physiologischen Eigenschaften, welche das passive Targeting ermöglichen. Das Grundprinzip des EPR-Effekts ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Das Endothel der Blutgefäße von Tumorgewebe und gesundem Gewebe unterscheidet sich in seiner Durchlässigkeit. Größere Poren im Endothel von Tumor-Blutgefäßen machen es auch für größere Moleküle durchlässig [69, 199, 208, 232] (*enhanced permeability*). Gleichzeitig ist die Versorgung mit Lymphgefäßen in Tumorgewebe sehr viel geringer als in gesundem Gewebe. Einmal aufgenommene Wirkstoffe können deshalb kaum wieder aus dem Tumorgewebe abtransportiert werden [69, 199, 208], sie werden im Tumorgewebe angereichert (*enhanced retention*).

Für viele Tumorarten konnte nachgewiesen werden, dass der EPR-Effekt zur Anreiche- rung von Wirkstoffen genutzt werden kann [51, 63, 84, 89, 176]. Bei einigen Krankheitsbil-

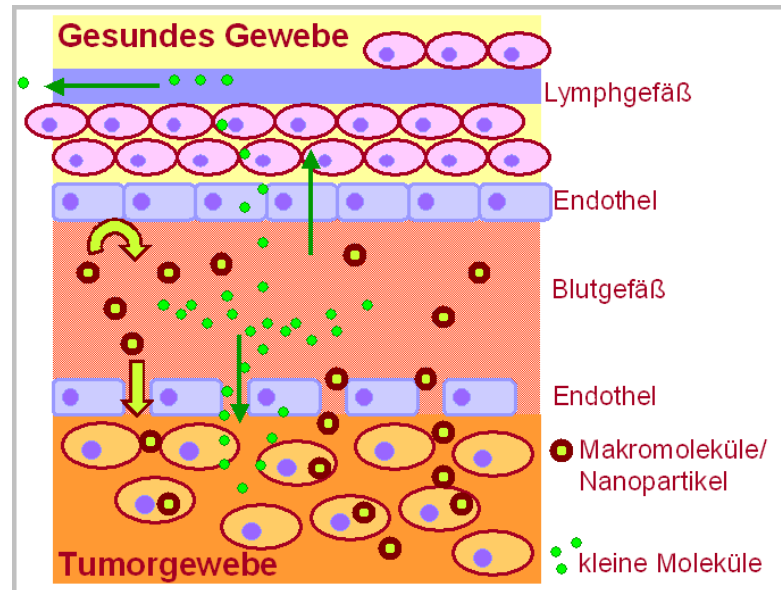


Abbildung 1.5: Prinzip des EPR-Effekts: das Endothel der Blutgefäße weist in Tumorgewebe größere Lücken auf. Größere Partikel oder Makromoleküle können ins Tumorgewebe diffundieren (*enhanced permeability*), aber nicht in gesundes Gewebe. Kleine Moleküle können sowohl das Blutgefäßendothel von gesundem als auch das von Tumorgewebe passieren. In gesundem Gewebe können Moleküle über das Lymphsystem ausgeschieden werden. In Tumorgewebe sind kaum Lymphgefäße vorhanden, deshalb können Wirkstoffe dort nicht nur aufgenommen, sondern auch gespeichert werden (*enhanced retention*).

dern kann der EPR-Effekt auch in infiziertem, entzündetem, nicht tumorösem Gewebe für passives Targeting genutzt werden [63, 148, 212].

Die Größe der Poren kann sehr unterschiedlich sein, abhängig davon, welches Organ vom Tumor betroffen ist [60, 84, 233, 234]. Die maximale Größe der Partikel, die über den EPR-Effekt aufgenommen werden können, liegt zwischen 400 nm und 600 nm [234].

Die Effizienz des EPR-Effekts und die Größe der Poren lässt sich über den Blutdruck beeinflussen. Maeda et. al. und Nagamitsu et. al. konnten einen positiven Einfluss auf die Spezifität passiver Wirkstofftransporter durch blutdrucksteigernde Wirkstoffe nachweisen [124, 139].

Ein großes Problem in der Krebstherapie ist das in vielen Tumoren auftretende Phänomen der *Multi Drug Resistance* (MDR). Membranständige Proteine, die so genannten *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter transportieren zellfremde Wirkstoffe aus den Zellen bevor diese ihre toxische Wirkung entfalten können [78].

Durch passive Wirkstofftransporter konnte auch MDR umgangen werden [88, 98, 106, 126]. Beispielsweise Nano-Wirkstofftransporter wie Styren-Maleinsäure (SMA)-Mizellen schirmen die Wirkstoffe gegen MDR-Rezeptoren ab, bis sie innerhalb der Zellen freigesetzt

werden und dort ihre toxische Wirkung entfalten [126].

Nach mehreren Jahren experimenteller Forschung über den EPR-Effekt ist im letzten Jahr (2010) von Hara et. al. eine erste theoretische Arbeit zur Modellierung der Wirkstoffaufnahme in Tumoren durch passives Targeting veröffentlicht worden [77]. Über Parameter wie Größe der Transporter, des Tumors und des Organismus kann über dieses Modell die Wahrscheinlichkeit berechnet werden, mit welcher sich die Wirkstoffe nach bestimmter Inkubationszeit in einem Tumor anreichern. Ziel ist es, optimale Kriterien für die Entwicklung neuer passiver Wirkstofftransporter zu definieren.

1.3.2 Aktives Targeting von Tumoren - Antikörper

Aktives Targeting wird durch die Bindung des Wirkstoffes an bestimmte Biomoleküle erreicht, welche spezifisch von bestimmten Rezeptoren der Zielzellen erkannt werden. Häufig werden dazu AK verwendet.

Ein Rezeptor ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), welcher in vielen Krebszelltypen überexprimiert wird [184, 191]. EGFR-spezifische AK wie der in dieser Arbeit verwendete AK Erbitux finden beispielsweise in der Chemotherapie von Brustkrebs Verwendung.

Die Spezifität und Selektivität von AK kann jedoch sehr unterschiedlich sein. Tumorzellen sind sehr vielfältig und können sich nicht nur je nach Art des Tumors, sondern auch von Patient zu Patient und sogar innerhalb eines Patienten stark unterscheiden [68, 228]. Die Diversität ist, aufgrund der deutlich höheren Mutationsrate, bei Tumorzellen noch größer als bei gesunden Zellen. Es konnten bis zu 90 Zellvariationen innerhalb eines Tumorpatienten gefunden werden. Vor diesem Hintergrund ist das Konzept des aktiven Targetings für die Behandlung von Tumoren sehr schwierig [197, 228]. Das wird durch viele klinische Studien mit geringem Erfolg an neu entwickelten, AK-basierten Wirkstofftransportern bestätigt [126].

1.4 Nanopartikel als Wirkstofftransporter

Vor allem innerhalb der letzten 10 Jahre gewannen NP als Wirkstofftransporter immer größere Bedeutung [35, 53, 104, 196]. Sowohl anorganische (siehe Unterabschnitt 1.4.1) als auch biodegradierbare (siehe Unterabschnitt 1.4.2) Materialien werden zur Herstellung nanopartikulärer Wirkstofftransporter verwendet.

Aufgrund ihrer Größe sind viele NP für passives Targeting geeignet. Verschiedene Oberflächenmodifizierungen ermöglichen jedoch auch ein aktives Targeting oder die Kombination beider Prinzipien [49, 104].

Mit einer Größe von deutlich mehr als 1000 Da sind die meisten NP zu groß, um die Zytoplasmamembran zu permeieren [59]. Daher werden sie innerhalb des Zielgewebes mittels Endozytose [40] aufgenommen [183]. Durch die endozytotische Aufnahme gelangen die NP über die Endosomen in die Lysosomen.

Bei der Entwicklung neuer NP als Wirkstofftransporter wird vor allem auf eine hohe Beladungskapazität geachtet [65, 66, 196]. Die Beladung der NP kann auf zwei verschiedenen Wegen geschehen. Die Wirkstoffe können während des Prozesses der NP-Synthese

inkorporiert werden, oder durch adsorptive Wechselwirkungen an die bereits fertigen NP gebunden werden [196].

NP können bis zur Anreicherung im Zielgewebe lange in der Blutbahn zirkulieren ohne ausgeschieden zu werden. Auf diese Weise ermöglichen sie eine Dosis-unabhängige Aufnahmekinetik ohne Sättigungsgrenze und damit eine deutlich erhöhte Wirkstoffanreicherung [11].

1.4.1 Anorganische Nanopartikel

Anorganische NP, die als Wirkstofftransporter dienen sollen, werden aus Materialien hergestellt, welche möglichst inert sind. Die NP sollen *in vivo* keine chemischen Reaktionen mit der biologischen Umgebung eingehen, damit sie keine Nebenwirkungen verursachen. Häufig verwendet werden hierbei Materialien wie Gold [38, 49], Silika [80, 200] und verschiedene Metalle [9, 13, 14, 195, 203, 204, 216].

Anorganische NP werden nicht nur als Wirkstofftransporter, sondern oft auch zu diagnostischen Zwecken eingesetzt [195]. Hierfür werden vor allem physikalische Eigenschaften wie Magnetismus [9, 39, 195, 203, 204, 216] und Radioaktivität genutzt [85, 120, 143].

Die meisten anorganischen NP verbleiben nach der Behandlung im Körper, sie sind nicht biodegradierbar und meist zu groß um über die Nieren ausgeschieden zu werden.

Ein Weg dieses Problem zu umgehen ist die Verwendung von biodegradierbaren, organischen NP.

1.4.2 Biodegradierbare Nanopartikel

Biodegradierbare NP werden nach der Aufnahme in die Zielzellen enzymatisch abgebaut. Somit reichern sie Wirkstoffe im Zielgewebe an, werden aber langfristig selbst nicht dort angereichert. Es sind daher keine späteren Einflüsse dieser Transporter auf den behandelten Organismus zu befürchten.

Biodegradierbare NP werden aus Biomolekülen wie Lipiden [29, 209], Chitin [235] oder Proteinen, wie dem in dieser Arbeit verwendeten humanem Serumalbumin (HSA) [109, 112, 113, 221, 223] synthetisiert. Auch organische Polymere wie SMA [127, 133, 139] oder dem in dieser Arbeit eingesetzten PLGA [19, 71, 103, 105, 149, 187, 194, 201] finden Verwendung.

Ein großer Vorteil der Biodegradierbarkeit ist die Fähigkeit der Freisetzung der Wirkstoffe in den Zielzellen. Durch den enzymatischen Abbau der NP sind die Wirkstoffe anschließend innerhalb der Zelle frei beweglich. Das ist vor allem bei der Verwendung von PS als Wirkstoff notwendig.

Hohe lokale Konzentrationen des PS in oder auf den NP können zu starken Wechselwirkungen zwischen den PS-Molekülen führen, welche die Fähigkeit zur $^1\text{O}_2$ -Generierung beeinträchtigen, die PS würden dadurch inaktiviert vorliegen. Erst die Freisetzung innerhalb der Zelle würde zur Entfaltung der vollen Wirkung führen.

Diese Eigenschaften machen biodegradierbare NP in Verbindung mit Wirkstoffen der PDT zu einem besonders interessanten Forschungsobjekt. Bisher gibt es in der klinischen

Anwendung kein Wirkstofftransportsystem das eine Applikation von inaktiven PS in Verbindung mit einer Aktivierung im Zielgewebe ermöglicht.

Die Entwicklung eines biodegradierbaren Wirkstofftransporters für PS der dies ermöglicht würde Nebenwirkungen von bisherigen PDT Anwendungen deutlich verringern.

Viele Tumorarten können bisher nicht durch PDT behandelt werden, weil es noch keine Möglichkeit gibt die PS gezielt in die Tumorzellen einzubringen und erst dort zu aktivieren. Daher würde die Möglichkeit des Targetings und der Applikation von vorerst inaktiven PS das mögliche Spektrum der Anwendung der PDT deutlich erweitern.

2 Material

2.1 Zellmodelle

2.1.1 Jurkatzellen

Als biologisches Modellsystem zur Untersuchung der photoaktiven Nanopartikel wurden Jurkatzellen (Klon E 6-1) verwendet, eine humane Krebszelllinie, welche von T-Lymphozyten eines an Leukämie erkrankten Patienten abstammt. Es handelt sich hierbei um eine einfach zu handhabende Suspensionszelllinie.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen mit optisch-spektroskopischen Methoden an lebenden Zellen durchgeführt. Dafür ist es nötig, die Zellen für die Dauer der Messungen in homogener Suspension in Küvetten zu halten. Da solche Methoden adhärente Zellen, welche für die Messung trypsiniert werden müssen, stark stressen, wurde für die Untersuchungen zunächst diese Suspensionszelllinie ausgesucht.

2.1.2 HT29-Zellen

HT29-Zellen sind humane Adenokolonkarzinomzellen. Im Gegensatz zu Suspensionszellen heften sich diese adhärenenten Zellen beim Wachsen an Oberflächen an.

Wie in vielen Gewebetumorzellen wird auch in HT29-Zellen der EGFR überexprimiert. Dieser Rezeptor wird vom AK Erbitux (Erb) erkannt. Da unter anderem auch mit Erb modifizierte PLGA-NP in dieser Arbeit untersucht wurden, bot sich eine Nutzung dieser Zelllinie an.

Um die Zellen zum Passagieren oder für ein Experiment vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen, werden sie mit Trypsin behandelt. Dieses Verdauungsenzym bewirkt den Abbau der Proteine, die Zell-Zell-Kontakte und das Anheften der Zellen am Untergrund ermöglichen. Nach der Trypsinierung verbleiben die Zellen für ca. 4 h bis 6 h in der Suspension und können daher für spektroskopische Untersuchungen verwendet werden. Es ist aber bei der Auswertung der Experimente immer zu bedenken, dass diese Behandlung erhöhten Stress für die Zellen darstellt.

Verglichen mit den Jurkatzellen verfügen die HT29-Zellen über einen im Verhältnis zum Gesamtzellvolumen kleineren Zellkern und damit über mehr Zytoplasma.

2.2 Arbeitsmaterial

Nährmedium für Jurkatzellen

RPMI1640 ohne Phenolrot mit L-Glutamin	PAA
FBS-Gold	PAA
Penicillin/Streptomycin	PAA

Tabelle 2.1: 500 ml RPMI 1640 werden mit 50 ml FBS-Gold und 5 ml der Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt. Im fertigen Medium liegen dann 10 % FBS, 2mM L-Glutamin, 500 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin vor.

Nährmedium für HT29-Zellen

DMEM ohne Phenolrot ohne L-Glutamin	PAA
FBS-Gold	PAA
L-Glutamin	PAA
Penicillin/Streptomycin	PAA

Tabelle 2.2: 500 ml DMEM werden mit 50 ml FBS-Gold, 10 ml der L-Glutaminlösung und 5 ml der Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt. Im fertigen Medium liegen dann 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 500 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin vor.

Sterile Puffer, Lösungen und Assays für die Zellkultur

Trypsin/EDTA	PAA
Ethanol	Merck
DMSO	Merck
PBS (pH 7,2)	PAA
Caspase-Glo® 3/7 Assay	promega

Tabelle 2.3: Sterile Puffer, Lösungen und Assays für die Zellkultur

Sonstiges Material in der Zellkultur

Brutschrank	Binder
Zentrifuge, Biofuge stratos	Heraeus
Sterilbank	BDK
Heißluftschrank zum Sterilisieren	MLW
Sterile Pipetten (10 ml, 25 ml, 50 ml)	greiner bio-one
Sterile Pipettenspitzen mit Filter	Roth
Mikroliterpipetten (0,5-20 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf
1,5 ml Caps	Roth
Sterile Tubes (15 ml, 50 ml)	greiner bio-one
24well-Platten (transparent)	greiner bio-one
96well-Platten (optischer Boden)	greiner bio-one
TC75-Flaschen für Suspensionszellen	greiner bio-one
TC25-Flaschen für Suspensionszellen	greiner bio-one
TC75-Flaschen für adhärente Zellen	greiner bio-one
TC25-Flaschen für adhärente Zellen	greiner bio-one
Bestrahlungsapparatur für Phototoxizitätsexperimente	Arbeitsgruppe Photo-biophysik
Inverses Mikroskop, CK X41	Olympus
IN Cell Analyzer 2000 cell imaging system	GE Healthcare
Platereader Victor ³	PerkinElmar
Objektträger und Deckgläschen	Roth
Fuchs - Rosenthal - Zählkammer	Roth

Tabelle 2.4: Laborgeräte und sonstiges Arbeitsmaterial

2 Material

Material in der Absorptions- und in der Fluoreszenzspektroskopie

Glasküvetten (3 ml, 0,5 ml)	Helma
Quarzglasküvetten (3 ml, 0,5 ml)	Helma
Kunststoffstopfen für Küvetten	Roth
Kleine Rührmagneten für Küvetten	Roth
Absorptionsspektrometer, UV-160A	Shimadzu
Anlage zur Messung stationärer Fluoreszenz	Beschreibung siehe Unterabschnitt 3.1.1
Anlage zur Messung der Laserflashphotolyse	Beschreibung siehe Unterabschnitt 3.1.2
Anlage zur stationären Messung von 1O_2	Beschreibung siehe Unterabschnitt 3.1.3

Tabelle 2.5: Material in der Absorptions- und in der Fluoreszenzspektroskopie

Material für konfokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM) und FLIM

CLSM (FluoViewTM FV1000)	Olympus
FLIM-Setup	PicoQuant
Objektträger	Roth
Deckgläschen	Roth
LysoSensor green	Molecular Probes
MitoTracker green	Molecular Probes
Immersionsöl	Roth

Tabelle 2.6: Material für CLSM und FLIM

3 Methoden

3.1 Spektroskopische Messaufbauten und Messverfahren

3.1.1 Stationäre Fluoreszenzspektroskopie

Um die intrazelluläre PS-Konzentration bestimmen zu können wird die Fluoreszenzintensität im Ethanolextrakt PS-inkubierter Zellen bestimmt (siehe Unterabschnitt 3.3.1). Diese Messung wird am Messaufbau für stationäre Fluoreszenz durchgeführt.

Eine schematische Darstellung des Messaufbaus ist in Abbildung 3.1 zu sehen. Der Aufbau ist L-förmig. Die Probe wird mit einer Xenon-Lampe (330-800 nm) angeregt, wobei die gewünschte Wellenlänge mit einem Monochromator (Oriel) eingestellt wird. Senkrecht zur Anregung wird das über eine Linse gebündelte Fluoreszenzlicht gesammelt und mit einer CCD-Kamera (Instapecc IV, Oriel) detektiert.

Gemessen wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Hierzu werden die Spektren im Bereich von 400 nm bis 800 nm, also im sichtbaren Bereich, aufgenommen. Vor jeder Fluoreszenzmessung wird der Hintergrund aufgenommen, dieser wird durch die Software direkt von der gemessenen Fluoreszenz subtrahiert.

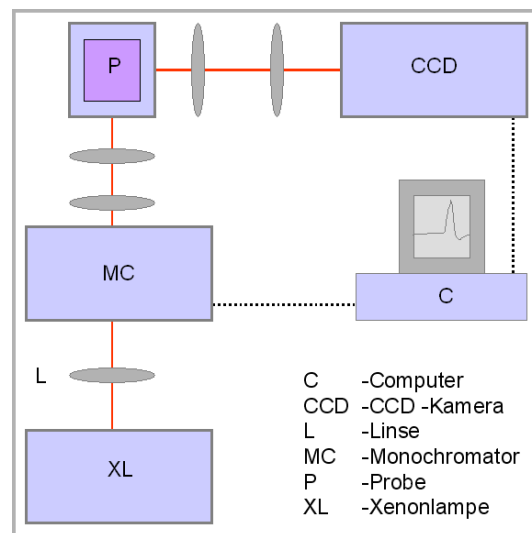


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau des Messplatzes für stationäre Fluoreszenz

3.1.2 Laserflashphotolyse

Die Laserflashphotolyse (LFP) ist eine indirekte Methode um die 1O_2 -Generierung in lebenden Zellen zu bestimmen. Mittels LFP kann die Triplettabklingzeit des PSs in Zellen gemessen werden. Die unterschiedlichen Triplettabklingzeiten in An- und Abwesenheit von molekularem Sauerstoff, also mit und ohne Wechselwirkung des PS mit Sauerstoff, geben Auskunft über die 1O_2 -Quantenausbeute Φ_Δ [150].

Φ_Δ kann mit folgender Formel (Gleichung 3.1) berechnet werden [22]:

$$\Phi_\Delta = \Phi_T S_Q S_\Delta = \Phi_T \frac{k_{O_2}}{k_p + k_{else} + k_{O_2}} S_\Delta \quad (3.1)$$

Φ_T ist die Triplettquantenausbeute des PSs, S_Q beschreibt alle Deaktivierungsprozesse, an welchen Sauerstoff beteiligt ist. S_Δ entspricht dem Anteil von S_Q , der durch 1O_2 -Generierung erzeugt wird. k_{O_2} , k_p und k_{else} sind Ratenkonstanten. k_{O_2} beschreibt die Umsetzungsrate aller vom Sauerstoff abhängigen Prozesse. k_p beschreibt den Anteil der Energieübertragungsprozesse, die mit Lumineszenz einhergehen. k_{else} ist die Ratenkonstante für die strahlungslosen Deaktivierungsprozesse.

S_Q kann auch mit Hilfe der Triplettabklingzeiten dargestellt werden (Gleichung 3.2) [146]:

$$\Phi_\Delta = \Phi_T S_Q S_\Delta = \Phi_T \frac{\tau_{N_2} - \tau_{air}}{\tau_{N_2}} S_\Delta \quad (3.2)$$

τ_{air} ist die Triplettabklingzeit des PSs bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff. τ_{N_2} ist die Triplettabklingzeit des Farbstoffs bei Abwesenheit von Sauerstoff. Um molekularen Sauerstoff aus den Proben zu evakuieren wurden diese 20 min mit Stickstoff begast.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten PS führt nahezu jede Wechselwirkung des PSs im Triplettzustand mit molekularem Sauerstoff zur Generierung von 1O_2 . Daher kann S_Δ als ≈ 1 angenommen werden [22].

Der Messaufbau der LFP ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Als Anregungslichtquelle dient ein Nanosekunden-Nd₃₊-YAG Pumplaser optisch parametrischer Oszillator (OPO) (Ekspla 342/1, 420 nm bis 2500 nm). Als Lichtquelle für den Messstrahl für die Transmissionsmessung dient eine Licht emittierende Diode (LED) ($\lambda_{max} = 490$ nm). Um Störungen durch Streulicht zu vermindern, wird ein Bandpassfilter (488 nm) verwendet. Als Detektor wird eine Si-Photodiode mit integriertem schnellem Vorverstärker (Elektronik Manufaktur Mahlsdorf) benutzt, der speziell für diesen Messaufbau zur Optimierung des Signal-Rauschverhältnisses entwickelt wurde. Die Messdaten werden über ein Speicheroszilloskop (HP5415) an einen Computer übermittelt.

Die Zeitkonstanten τ_{air} und τ_{N_2} werden durch zeitaufgelöste Absorptionsmessung nach Anregung mit kurzen Laserimpulsen bestimmt. Anregungsimpuls und Messstrahl treffen im rechten Winkel auf die Küvette (siehe Abbildung 3.2). Die Bestimmung der Triplettabklingzeiten aus der Absorptionsmesskurve ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

3.1 Spektroskopische Messaufbauten und Messverfahren

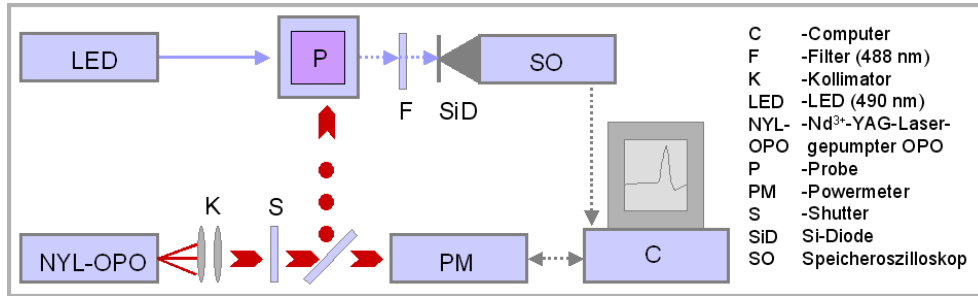


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau des Laserflashphotolyse-Messplatzes

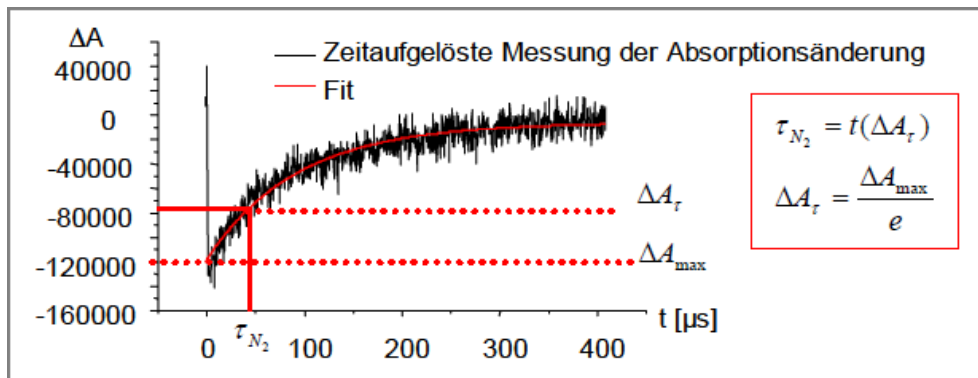


Abbildung 3.3: Beispiel für eine Laserflashphotolyse -Messkurve. Dargestellt ist die Differenz zwischen der Absorption der angeregten Probe und des Grundzustands in Abhängigkeit von der Zeit. Die Anregung findet zum Zeitpunkt $t=0$ statt.

3.1.3 Zeitaufgelöste Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz-Detektion

Die Fähigkeit der PS 1O_2 zu generieren ist die wichtigste Voraussetzung für eine effektive Photosensibilisierung und hängt maßgeblich von ihrer Mikroumgebung ab. Deshalb ist die Messung der 1O_2 -Lumineszenz in photosensibilisierten Zellen von besonderem Interesse. Für diese Messungen wurde in unserer Arbeitsgruppe von Jan Schlothauer eine neue Messapparatur aufgebaut [188]. Der schematische Aufbau der Messapparatur ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Für die Messungen werden 10 ml inkubierter Zellsuspension mit 500 000 Jurkatzellen/ml mit PBS gewaschen (3 min, 350×g) und anschließend in 3ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wird mit einem YAG-gepumten Farbstofflaser bestrahlt. Die Wellenlängen mit welcher die Zellsuspensionen bestrahlt werden hängen vom verwendeten PS ab, sie sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Die Bestrahlungsdauer beträgt 20 s, die mittlere Leistung 500 μ W.

Die Lumineszenz des während der Bestrahlung generierten 1O_2 wurde mit dem neuen Messaufbau aufgenommen.

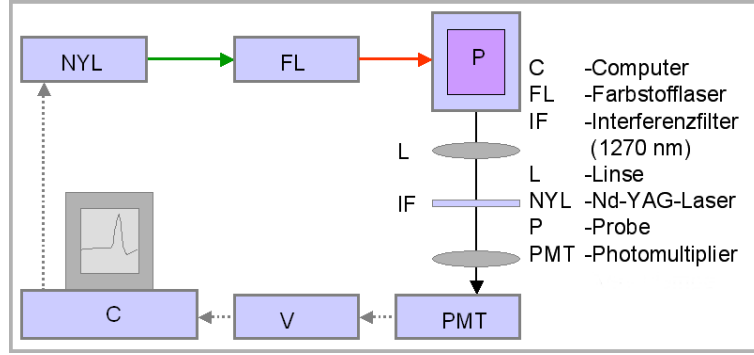


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau des Messplatzes für zeitaufgelöste 1O_2 -Lumineszenzmessungen

PS	$\lambda_{ex}[nm]$
mTHPP	532
mTHPC	552
Pheo	552

Tabelle 3.1: λ_{ex} für die zeitaufgelöste 1O_2 -Lumineszenz-Detektion in Zellsuspensionen abhängig vom untersuchten PS

Die Intensität der gemessenen 1O_2 -Lumineszenz kann mittels folgender Gleichung 3.3 berechnet werden [146].

$$I(t) = A \cdot \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\Delta}}\right) - \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \right] \cdot \frac{\tau_{\Delta}}{\tau_{\Delta} - \tau_T} \quad (3.3)$$

$I(t)$ ist die Intensität der 1O_2 -Lumineszenz, A ist eine Konstante die von verschiedenen Parametern und der Polarität der Mikroumgebung des PS abhängt. t ist die Zeit. τ_{Δ} beschreibt die 1O_2 Lumineszenzlebensdauer und τ_T ist die Triplettlebensdauer des PSs, welche mittels LFP (siehe Unterabschnitt 3.1.2) bestimmt wird.

3.2 Handhabung der Zellkulturen

3.2.1 Kultivierung von Jurkat- und HT29-Zellen

Die **Jurkatzellen** in T75-oder T25-Zellkulturflaschen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wird die Zellsuspension mit frischem Nährmedium auf ca. 200 000 Zellen/ml verdünnt. Mindestens drei Viertel des Gesamtvolumens sollten frisches Medium sein. Wenn die Zellzahl für die Verdünnung zu gering ist, oder eine größere Menge an Zellen gebraucht wird, können die Zellen zentrifugiert (3 min, $350 \times g$) und komplett in frischem Nährmedium aufgenommen werden.

Die **HT29-Zellen** werden ebenfalls in T75-oder T25-Zellkulturflaschen kultiviert. Hierfür werden beschichtete Kulturflaschen verwendet die den adhären Zellen das Anheften an der Oberfläche erleichtern.

Alle zwei bis drei Tage wird das Medium gewechselt. Zusätzlich werden die Zellen einmal pro Woche passagiert. Dazu werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Ein Teil der Zellen wird mit frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt, die Suspension sollte etwa 50 000 Zellen/ml enthalten. Die Zellzahl wird nach Vitalfärbung eines 100 μ l-Aliquots mit Trypanblau unter dem Lichtmikroskop mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Trypsinreste brauchen nicht entfernt werden, weil Bestandteile des im Nährmedium enthaltenen FBS Trypsin-inhibierend wirken.

Beide Zelllinien werden bei 37°C, 5% CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert.

Die Nährmedien und die Trypsin/EDTA-Lösung werden im Kühlschrank gelagert. Vor der Verwendung werden alle Lösungen, Puffer und Nährmedien im Wasserbad auf 37°C temperiert. Alle Arbeiten in der Zellkultur werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die dabei zum Einsatz kommende sterile Werkbank wird vor und nach Gebrauch mit 70%igem Ethanol gereinigt. Auch Handschuhe, Pipettierhilfen und andere Materialien, die unter der Sterilbank verwendet werden, werden zuvor mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Sterile Pipettenspitzen und serologische Pipetten werden nur einmal verwendet.

3.2.2 Inkubation zur Photosensibilisierung der Jurkatzellen und HT29-Zellen

Zur Optimierung der Vergleichbarkeit der verschiedenen Experimente wurden die Inkubationskonzentrationen und -zeiten einheitlich gewählt.

Unabhängig davon, ob die PS in ethanolischer Lösung oder mittels NP-Suspension verabreicht werden, beträgt die PS-Konzentration im Nährmedium immer 3 μ M. Für die Inkubation mit den freien, nicht wasserlöslichen PS wird eine 1 mM ethanolische Stammlösung hergestellt. Diese wird langsam unter Rühren mit dem Nährmedium bis zur Konzentration von 3 μ M verdünnt. Die langsame Verdünnung verhindert die Bildung von PS-Aggregaten.

Die Ethanolkonzentration im so behandelten Medium beträgt 0,3 %. Diese Konzentration ist für die Zellen nicht toxisch. Das optimale Verhältnis aus der nicht toxischen Ethanolkonzentration, aber effektiv phototoxischen PS-Konzentration wurde während meiner Diplomarbeit bestimmt [161].

Die NP befinden sich in einer wässrigen Suspension und können direkt ins Nährmedium gegeben werden.

Eine besondere Schwierigkeit bei der Inkubation von lebenden Zellen mit PS ist die Lichtempfindlichkeit. Die Zellen müssen komplett im Dunkeln inkubiert werden. Um trotzdem das sterile Hantieren mit den Zellen zu ermöglichen wurde eine Lichtquelle aus orangenen LED für das Zelllabor gebaut. Das Licht dieser LEDs wird nicht von den PS absorbiert und kann den Zellen somit nicht schaden. Dass diese Lichtquelle keinen Einfluss auf die Phototoxizität der PS hat, wurde von Carmen Ludwig in ihrer Diplomarbeit nachgewiesen [121].

Um die Veränderungen während der endozytotischen Aufnahme der NP und während der lysosomalen Freisetzung der PS beobachten zu können wurden alle Experimente mit

3 Methoden

den Inkubationszeiten 1 h, 3 h, 5 h und 24 h durchgeführt.

Die Inkubation findet im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 und 100 %iger Luftfeuchtigkeit statt.

Vor Beginn einer Messung werden die inkubierten Zellen gewaschen, Jurkatzellen mittels Zentrifugation (350×g, 3-10 min je nach Probenvolumen), die adhärenzte HT29-Zellen durch Austausch des Mediums mit PBS. Auf diese Weise wird sicher gestellt, dass ausschließlich Effekte durch intrazelluläre PS gemessen werden.

3.3 *In vitro* Untersuchungen

3.3.1 Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme der Photosensibilisatoren

Die Jurkat- oder HT29-Zellen werden mit den zu untersuchenden PS beladenen NP in T25 Flaschen inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen 1 h, 3 h, 5 h und 24 h. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Dazu werden Jurkatzellen für je 3 min bei 350×g zentrifugiert. Die adhärenzten HT29-Zellen können direkt durch Austausch des Mediums mit frischem PBS gewaschen werden.

Nach dem Waschen werden das Jurkat-Zellpellet beziehungsweise die HT29-Zellen bei -20°C für mindestens 20 min eingefroren. Dadurch werden die Zellmembranen zerstört, und die freigesetzten Farbstoffmoleküle können anschließend in Ethanol extrahiert werden. Die aufgetauten Zellen werden dazu in 1 ml Ethanol homogenisiert und für 5 min mit Ultraschall behandelt. Die Ultraschallbehandlung zerkleinert größere Zellbrocken, damit die PS-Moleküle vollständig in die ethanolische Lösung übergehen. Danach werden die Zellreste mittels Zentrifugation (5000×g, 5 min) entfernt. Nun kann die Farbstoffkonzentration im ethanolischen Überstand bestimmt werden [172].

Zur Bestimmung der PS-Konzentration im Ethanolextrakt wird das Emissionsspektrum der Probe mit dem Messaufbau für stationäre Fluoreszenz aufgenommen (siehe Unterabschnitt 3.1.1). Dazu wird der Extrakt in Glasküvetten mit Ethanol auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt. Die Anregungswellenlänge beträgt $\lambda_{ex}=410$ nm. Eine ethanolische PS-Lösung mit bekannter Konzentration dient als Standard.

Zur Bestimmung der Konzentration in der Lösung wird die Fläche unter der Kurve zwischen 600 nm und 800 nm bestimmt. Diese wird mit der des Spektrums des Standards verglichen. Um aus der Konzentration im Ethanolextrakt die intrazelluläre Konzentration zu berechnen, müssen die Zellzahl und das Zellvolumen einbezogen werden.

Das Zellvolumen wird unter der Annahme berechnet, dass die Zellen annähernd kugelförmig sind und einen mittleren Durchmesser von 10 μm (Jurkatzellen) beziehungsweise 12 μm (HT29-Zellen) haben [181]. Diese Größe wurde mittels CLSM-Messungen überprüft.

3.3.2 Endozytosenachweis mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie

Zur qualitativen Untersuchung der endozytotischen Aufnahme der an Nanopartikel gekoppelten PS und deren intrazellulären Lokalisation werden die inkubierten Zellen

mittels CLSM untersucht.

Zum Nachweis der PS in den Zellen werden deren Fluoreszenzeigenschaften genutzt. Die Bestimmung der intrazellulären Verteilung erfolgt unter Einsatz zweier unterschiedlicher Lokalisationsmarker, LysoSensor green und MitoTracker green.

Die spektralen Eigenschaften von LysoSensor green weisen eine starke pH-Abhängigkeit auf. Daher kann seine Lokalisation in den Endosomen (pH 5,0-5,5) und Lysosomen (pH 4,5-5,0) detektiert werden. MitoTracker green hingegen reichert sich insbesondere in den Mitochondrien an und dient somit als spezifischer Marker für diese Organellen.

Befindet sich der PS in unmittelbarer Nähe zu LysoSensor green bzw. MitoTracker green, kommt es zu einer Überlagerung der jeweiligen Emissionsspektren. Dadurch kann die Lokalisation des Photosensibilisators in den jeweiligen Organellen fluoreszenzmikroskopisch ermittelt werden.

Beide Fluoreszenzmarker liegen zunächst in DMSO gelöst vor. Sie werden 30 min vor dem Ende der Inkubationszeit zu den Zellen gegeben. LysoSensor green wird dabei in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt, MitoTracker green mit 0,5 μM .

Um Hintergrundsignale zu vermeiden, müssen die Zellen vor dem Mikroskopieren mit eiskühlem PBS gewaschen werden (Jurkatzellen: 4 °C, 350×g, 3 min). Um weitere intrazelluläre Prozesse zu unterdrücken, werden die Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit eiskühlt.

Bei Versuchen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (1 h, 3 h, 5 h und 24 h) müssen die Zellen zeitlich versetzt behandelt werden, so dass sie erst unmittelbar vor dem Mikroskopieren gewaschen werden. Es sollten nicht mehr als 30 min zwischen dem Ende der Inkubation und dem Mikroskopieren liegen.

Die Aufnahmen wurden mit dem CLSM gemacht. Zur Fluoreszenzanregung des LysoSensors und des PSs wurde eine Laserdiode mit 405 nm und zur Anregung des MitoTrackers eine Laserdiode mit 488 nm verwendet. Die Fluoreszenz von LysoSensor und MitoTracker ist bei $\lambda_{em}=520$ nm detektiert worden, die des PSs bei $\lambda_{em}=673$ nm.

In der graphischen Auswertung der Signale wird die Fluoreszenz von LysoSensor und MitoTracker in grün und die des PSs in rot dargestellt. Kommt es zur Überlagerung von rotem und grünem Emissionslicht, resultiert daraus ein gelbes Signal.

Um Artefakte zu vermeiden, müssen auch unbeladene NP und Zellen ohne Photosensibilisatoren und Organellmarker untersucht werden. Die Einstellungen der Anregungs- und Detektionsintensitäten müssen so gewählt werden, dass in diesen Kontrollproben keine Signale detektierbar sind.

Zum Mikroskopieren der Jurkatzellen werden 10 μl Zellsuspension auf ein Deckgläschen pipettiert und anschließend mit einem zweiten Deckgläschen bedeckt. Da HT29-Zellen adhärent wachsen, können diese direkt auf Deckgläschen in 6well-Platten oder auf μ -Slides angezüchtet werden.

3.3.3 Nachweis der intrazellulären Photosensibilisator-Freisetzung mittels Fluorescence Lifetime Imaging

Die Fluoreszenzlebensdauer ist die mittlere Zeit, die ein angeregtes Molekül braucht um durch Emission eines Photons und den Grundzustand zu relaxieren. Die Fluoreszenzle-

bensdauer hängt nicht nur von der Struktur des fluoreszierenden Moleküls, sondern auch von seinen Wechselwirkungen mit anderen Molekülen in seiner Mikroumgebung ab.

Die Freisetzung der PS von den NP innerhalb der Zellen kann anhand der damit verbundenen Änderung der Fluoreszenzlebensdauern verfolgt werden. Die endozytotisch aufgenommenen biodegradierbaren NP werden im Idealfall in den Lysosomen durch den niedrigen pH-Wert und die lysosomalen Enzyme zersetzt. Die Zersetzung der NP ermöglicht eine effektive Verteilung der membrangängigen PS im Bereich des Zytoplasmas.

Die verschiedenen Wechselwirkungen des PS mit den NP, biologischen Membranen, intrazellulären Proteinen und sonstigen Bestandteilen des Zytoplasmas verändern die Fluoreszenzlebensdauer des PS. Diese Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauer im Verlauf des Drugrelease-Prozesses kann mittels FLIM detektiert werden.

Während der Aufnahme am CLSM wird in jedem Bildpunkt die Fluoreszenzlebensdauer der PS-Fluoreszenz gemessen. Die verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern werden im Bild mittels Farbcodierung wiedergegeben. Die Software bietet neben der bildlichen Auswertung auch die Möglichkeit einer statistischen Auswertung der gemessenen Lebensdauern in Form von Histogrammen.

Auch für die FLIM-Experimente wurden Jurkatzellen 1 h, 3 h, 5 h und 24 h mit den PS inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit dem CLSM mit FLIM-extension gemacht. Zur Fluoreszenzanregung diente ein ns-gepulster Laser ($\lambda_{ex} = 440$ nm).

3.3.4 Bestimmung der Phototoxizität und Dunkeltoxizität

3.3.4.1 Inkubation und Bestrahlung

Alle Phototoxizitätstests wurden auf 96well-Platten (Jurkatzellen) oder 24well-Platten (HT29-Zellen) durchgeführt. Um Zellen auf solchen Kulturplatten einheitlich bestrahlen zu können wurde von Christoph Feest während seiner Diplomarbeit eine neue Bestrahlungseinheit entwickelt [54]. Als Lichtquelle dienen in dieser Apparatur Weißlichtdioden. Das Wirkungsspektrum der Dioden ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Einige Experimente wurden noch mit einer älteren Bestrahlungseinheit durchgeführt. In dieser Bestrahlungseinheit wurden monochrome Laserdioden als Lichtquelle genutzt. Mit dieser Bestrahlungsapparatur konnten nur 96well-Platten mit schwarzen Wänden, jedes well einzeln, bestrahlt werden. Die Auswahl der Laserdioden schränkte die Auswahl der möglichen PS ein. Eine schematische Darstellung dieser Bestrahlungsapparatur ist in Abbildung 3.6 zu sehen.

Durch die Nutzung der Weißlichtdioden kann die neue Apparatur für alle PS verwendet werden. Die Geometrie der Apparatur ermöglicht eine gleichzeitige und gleichmäßige Bestrahlung aller wells auf der Platte, somit können die preiswerteren Platten mit durchsichtigen Wänden verwendet werden. Auch Petrischalen und T25-Zellkulturflaschen lassen sich damit bestrahlen.

Die Bestrahlungsdauer hängt von der erwünschten Strahlungsdosis ab. Typische Strahlungsdosen für Phototoxizitätstests liegen zwischen 200 mJ/cm^2 und 350 mJ/cm^2 , das entspricht Bestrahlungszeiten zwischen 30 s und 180 s.

Zur Bestimmung der Phototoxizität werden die bestrahlten Zellen weitere 60 min inkubiert. Anschließend stehen verschiedene Möglichkeiten der Phototoxizitätsbestimmung

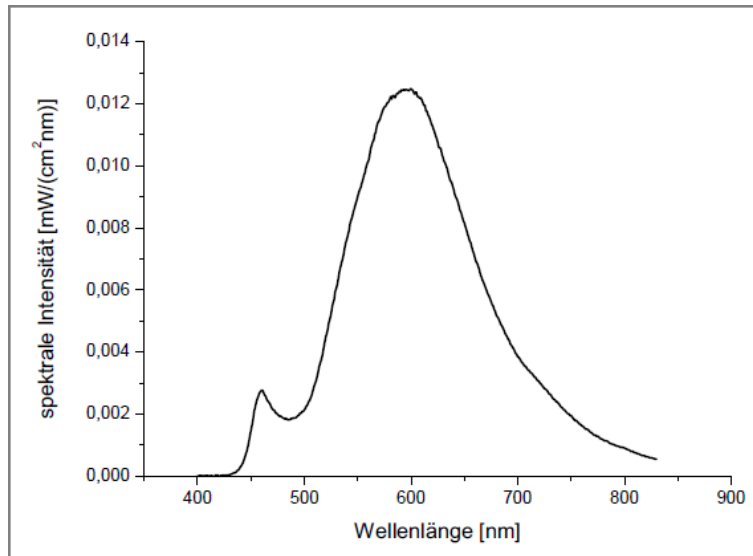


Abbildung 3.5: Wirkungsspektrum der Weißlichtdioden der Bestrahlungseinheit. Die von den Dioden emittierte Gesamtintensität beträgt 2 mJ/cm^2 .

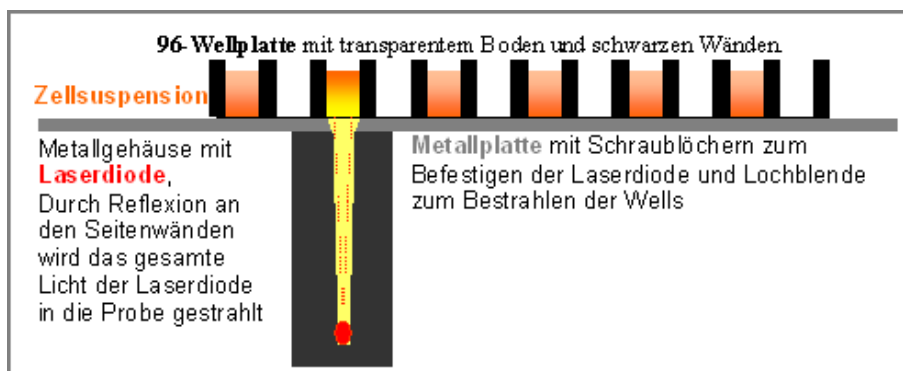


Abbildung 3.6: Alte Apparatur zur Bestrahlung der Zellen für die Bestimmung der Phototoxizität der Photosensibilisatoren. In dieser Apparatur dient eine monochrome Laserdiode als Lichtquelle, es kann jeweils nur ein Well einer 96well-Platte mit schwarzen Wänden bestrahlt werden.

zur Verfügung (siehe Abschnitte 3.3.4.2 und 3.3.4.3). Von besonderem Interesse ist die Bestimmung der Apoptoserate.

Zur Überprüfung der Dunkeltoxizität werden die Zellen genauso behandelt wie für die Phototoxizitätstests. Diese Zellen werden jedoch nicht bestrahlt und verbleiben bis zur Messung im Dunkeln.

3.3.4.2 Phototoxizitätstest mittels Vitalfärbung, lichtmikroskopische Auswertung

Die preiswerteste Methode zur Bestimmung der Zellvitalität, der Apoptoserate und der Nekroserate ist das Zählen der lebenden, der apoptotischen und der nekrotischen Zellen nach Trypanblaufärbung unter dem Lichtmikroskop.

Hierfür werden Jurkatzellen auf 24well-Platten (1 ml je Probe) inkubiert (siehe Unterabschnitt 3.2.2). Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen gewaschen und in frischem Medium resuspendiert. Ein 50 µl Aliquot jeder Probe wird auf Dunkeltoxizität überprüft. Der Rest der Proben wird in 150 µl Aliquots auf eine 96well-Platte pipettiert. Auf dieser Platte werden die Zellen bestrahlt.

Nach einer weiteren Stunde Inkubation können die apoptotischen, die nekrotischen, und die lebenden Zellen nach Trypanblaufärbung mittels Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden.

Diese Methode ist nur für Jurkatzellen geeignet. Die gesunden Jurkatzellen besitzen eine runde Form. Während der Apoptose ist bei diesem Zelltyp das apoptotische Blebbing sehr deutlich unter dem Mikroskop sichtbar (siehe Abbildung 3.7). Da im Verlauf der Apoptose die Zytoplasmamembran erhalten bleibt, werden apoptotische Zellen im Gegensatz zu nekrotischen nicht durch Trypanblau gefärbt.

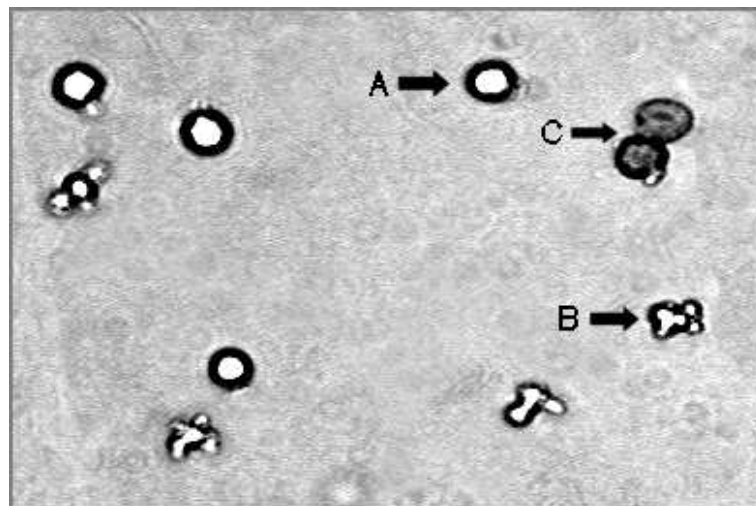


Abbildung 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahme (200fache Vergrößerung) von photosensibilisierten Jurkatzellen nach photodynamischer Behandlung und Vitalfärbung mittels Trypanblau. A: lebende Zelle, B: apoptotische Zelle mit charakteristischem Blebbing, C: Trypanblau gefärbte nekrotische Zelle

Um zu zeigen, dass diese Methode ähnliche Ergebnisse liefert wie der biochemische Apoptosenachweis mittels Caspase3/7-Assay (siehe Unterabschnitt 3.3.4.3) wurde ein Vergleichsexperiment mit Jurkatzellen durchgeführt, welche mit Pheo photosensibilisiert wurden (siehe Abbildung 3.8).

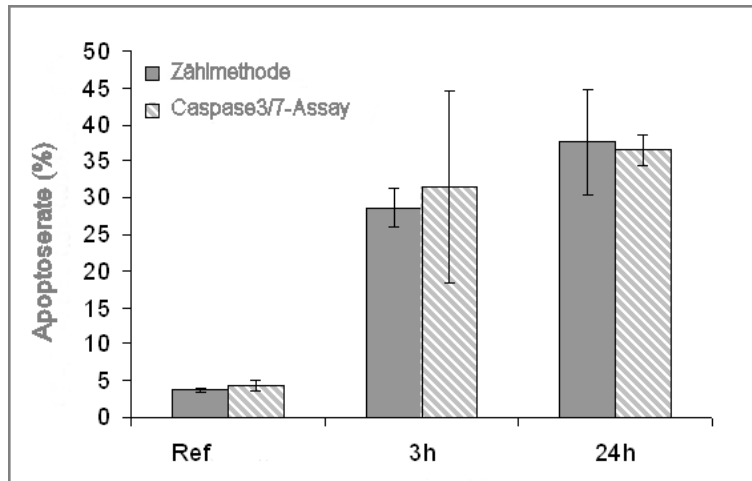


Abbildung 3.8: Vergleich der Ergebnisse der Zählmethode und des biochemischen Apoptosenachweises mittels Caspase 3/7-Assay. Jurkatzellen inkubiert mit 3 μ M Pheo. Bestrahlt mit der alten Apparatur mit LED ($\lambda_{ex} = 668$ nm) für 45 s; Bestrahlungsdosis ca. 100 mJ/cm². Dunkelgrau: Ergebnisse der Zählmethode; Grau gestreift: Caspase3/7 Assay. Es wurde zum Vergleich eine Staurosporin-Positivkontrolle gemessen, welche als 100% apoptotisch angenommen wird. Als Referenz (Ref) dienen Jurkatzellen, welche ohne PS inkubiert wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von je 6 Messwerten (n=6).

3.3.4.3 Apoptosenachweis mittels Caspase-Glo® 3/7 Assay

Zwei wichtige Schlüsselenzyme in der Apoptose humaner Zellen sind die Effektor-Caspasen, Caspase 3 und Caspase 7 (siehe Unterabschnitt 1.2.1). Die Aktivität dieser Caspasen lässt sich mittels des Caspase-Glo® 3/7 Assays über eine Chemilumineszenz-Reaktion nachweisen. Die Funktionsweise dieses Assays ist in der dem Assay beigelegten Anleitung beschrieben [1].

Für die Bestimmung der Phototoxizität mit dem Caspase-Glo® 3/7 Assay können sowohl Jurkat- als auch HT29-Zellen verwendet werden. Die Zellen werden dazu auf 96well-Platten inkubiert und bestrahlt (siehe Unterunterabschnitt 3.3.4.1).

Die Messung der Chemilumineszenzreaktion wird mit dem Platerader (Victor³) durchgeführt.

Um die Messung auswerten zu können ist es nötig auch wells mit Nährmedium ohne Zellen (Blank), nicht inkubierten Zellen (Negativkontrolle), inkubierten aber nicht bestrahlten Zellen (Dunkeltoxizität) und einer Apoptosepositivkontrolle zu messen.

Für die Positivkontrolle werden Zellen verwendet, die mit 1, 5 µM Staurosporin inkubiert wurden. Staurosporin ist ein Zellgift welches in humanen Zellen Apoptose auslöst [24]. Die Zellen der Positivkontrolle werden bei der Normierung der Messdaten als 100 % apoptotisch angenommen. Der Blankwert entspricht 0 % Apoptose.

Verglichen mit der Zählmethode (siehe Unterunterabschnitt 3.3.4.2) ist dieser Nachweis sehr teuer ohne dabei effizienter zu sein. Er wurde daher hauptsächlich benutzt um die Ergebnisse der Zählmethode zu verifizieren (siehe Abbildung 3.8).

4 Photosensibilisatoren und Nanopartikel

4.1 Untersuchte Photosensibilisatoren

In den folgenden Abschnitten sollen die in dieser Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren Phäophorbid a (Pheo), Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Porphyrin (mTHPP) und Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Chlorin (mTHPC) beschrieben werden. Die Strukturformeln der PS sind in Abbildung 4.1 zu sehen.

Bevor die PS *in vitro* getestet wurden, wurden sie von Kuan Chen photophysikalisch charakterisiert [37]. Einige charakteristische photophysikalische Parameter der PS sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst, in Abbildung 4.2 sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der PS zu sehen.

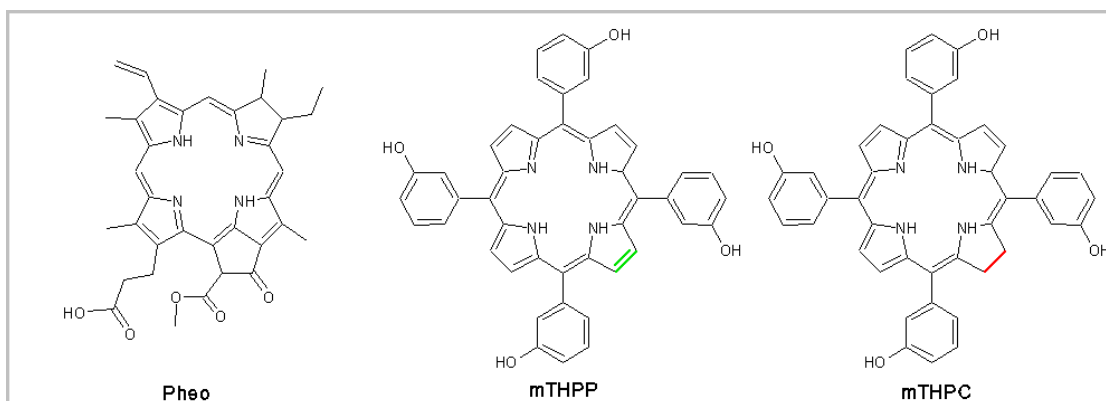


Abbildung 4.1: Strukturformeln der untersuchten Photosensibilisatoren Phäophorbid a, mTHPP und mTHPC. mTHPP und mTHPC unterscheiden sich nur in einer Doppelbindung (mTHPP, grün) beziehungsweise Einfachbindung (mTHPC, rot).

4.1.1 Phäophorbid a (Pheo)

Phäophorbid a (Pheo) ist ein Chlorin (siehe Abbildung 4.1) und stellt ein Derivat des Chlorophyll dar. Es kann aus Pflanzen oder Algen gewonnen werden. Das in dieser Arbeit verwendete Pheo wurde von Herrn Lutz Jäger aus der Alge *Spirulina* gewonnen.

Als PS ist Pheo aufgrund seiner hohen 1O_2 -Quantenausbeute (etwa 52 % in Ethanol siehe Tabelle 4.1) interessant. Da Pheo nur schwer wasserlöslich ist, und in wässriger Umgebung Aggregate bildet [108], sinkt hier die 1O_2 -Quantenausbeute auf weniger als

4 Photosensibilisatoren und Nanopartikel

	Pheo	mTHPP	mTHPC
Molekülmasse [g · mol ⁻¹]	593	688	686
λ_{max} [nm]* (Soretbande)	406	412	417
ϵ [Mol ⁻¹ cm ⁻¹]*	60600	521600	207000
λ_{max} [nm]* $S_{0,0} \Rightarrow S_{1,0}$	666	645	650
ϵ [Mol ⁻¹ cm ⁻¹]*	30000	9000	24000
λ_{max}^{Fl} [nm]*	673	648	652
Φ_{fl} (±1 %)*	0,22	0,06	0,07
Φ_{Δ} (±0,06)*	0,52	0,63	0,65

Tabelle 4.1: Eigenschaften der verwendeten PS, λ_{max} =Wellenlänge des Absorptionspeakmaximums, ϵ =molarer Extinktionskoeffizient im Maximum der Bande, λ_{max}^{Fl} =Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums, Φ_{fl} =Fluoreszenzquantenausbeute, Φ_{Δ} =¹O₂-Quantenausbeute, *Alle Werte wurden in ethanolischer PS-Lösung bestimmt. Messungen von Kuan Chen [36]

2 % [170]. Die Hydrophobizität des Pheo bewirkt, dass es sich innerhalb von Zellen vor allem in Membranen einlagert oder an Proteine mit hydrophoben Bereichen bindet. Eine Carboxyl- und eine Carbonylgruppe bewirken einen Polaritätsgradienten über das ganze Molekül. Dieser Gradient ermöglicht eine besonders gute Membrangängigkeit des Moleküls. Eine intrazelluläre Anreicherung von Pheo wurde in den Membranen von endoplasmatischem Retikulum (ER), Golgi-Apparat und vor allem Mitochondrien beobachtet [116,150].

In Abbildung 4.2 sind das Absorptions- und das Fluoreszenzspektrum von Pheo zu sehen. Beide Spektren zeigen die typische Form von metallfreien Tetrapyrrolen. Die besonders intensive Soretbande liegt bei 406 nm, die charakteristischen 4 Q-Banden liegen im Bereich von 480 nm bis 700 nm. Die Absorption der Q-Banden liegt im roten Spektralbereich und damit im Diagnostischen Fenster (siehe Abbildung 1.1). Dies ermöglicht die klinische Anwendung als PS in der Humanmedizin.

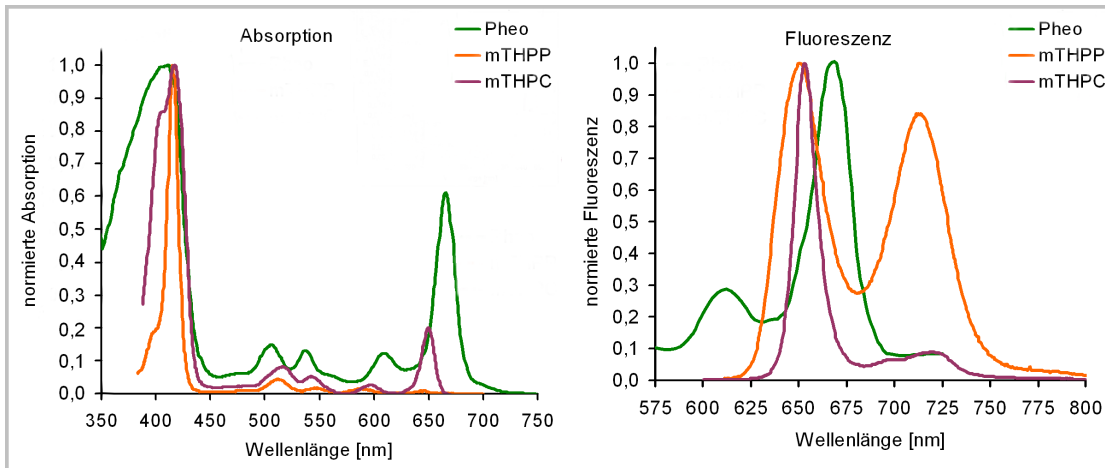


Abbildung 4.2: Normiertes Absorptions-(links) und Fluoreszenzspektren (rechts) von Pheo, mTHPP und mTHPC.

4.1.2 Meta-tetra(hydroxy-phenyl)-porphyrin (mTHPP)

Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Porphyrin (mTHPP) ist ein Porphyrin (Strukturformel siehe Abbildung 4.1) das durch seine starke Molekülsymmetrie auffällt. Das in dieser Arbeit verwendete mTHPP wurde in der Firma biolitec AG synthetisiert und durch Herrn Dr. Arno Wiehe zur Verfügung gestellt.

Die $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute von mTHPP (etwa 63 % in Ethanol, siehe Tabelle 4.1) ist sehr hoch, damit erfüllt es eine der wichtigsten Eigenschaften eines effizienten PS. Wie Pheo ist auch mTHPP relativ hydrophob.

In Abbildung 4.2 sind das Absorptions- und das Fluoreszenzspektrum von mTHPP zu sehen. Die im Vergleich zu Pheo sehr schmale Soretbande von mTHPP liegt bei 415 nm, die charakteristischen 4 Q-Banden sind nur schwach ausgeprägt und liegen im Bereich von 500 nm bis 660 nm. Die Absorption der Q-Banden liegt im roten Spektralbereich und damit im Diagnostischen Fenster (siehe Abbildung 1.1).

4.1.3 Meta-tetra(hydroxy-phenyl)-chlorin (mTHPC)

Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Chlorin (mTHPC) ist ein Chlorin (Strukturformel siehe Abbildung 4.1). Das Chlorin unterscheidet sich vom Porphyrin durch eine fehlende Doppelbindung in einem Pyrrolring im Tetrapyrrolgrundgerüst, diese sind in Abbildung 4.1 durch Pfeile gekennzeichnet. Dieser sehr kleine Unterschied in der Molekülstruktur des mTHPC verglichen mit mTHPP verursacht einen leichten Polaritätsgradient über das Molekül. Dies ermöglicht eine erleichterte Anreicherung dieser Moleküle in biologischen Membranen mit starken Polaritätsgradienten, wie zum Beispiel der inneren Mitochondrienmembran.

Das in dieser Arbeit verwendete mTHPC wurde im Trinity College Dublin in der Arbeitsgruppe von Prof. Mathias Senge synthetisiert.

In Abbildung 4.2 sind das Absorptions- und das Fluoreszenzspektrum von mTHPC zu

sehen. Das Maximum der Soretbande von mTHPC liegt bei 417 nm, die charakteristischen 4 Q-Banden sind stärker ausgeprägt als die von mTHPP und liegen ebenfalls im Bereich von 500 nm bis 660 nm. Die Absorption der Q-Banden liegt im roten Spektralbereich und damit im Diagnostischen Fenster (siehe Abbildung 1.1).

Die 1O_2 -Quantenausbeute von mTHPC (etwa 65 % in Ethanol, siehe Tabelle 4.1) ist sehr hoch, damit erfüllt es eine der wichtigsten Eigenschaften eines effizienten PS. Wie Pheo und mTHPP ist auch mTHPC relativ hydrophob.

mTHPC ist der einzige der drei hier untersuchten PS der unter dem Trivialnamen Foscan bereits klinisch zugelassen ist und in der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses angewendet wird.

Bisher wird mTHPC ohne spezifische Wirkstofftransporter angewendet. Die Anreicherung des PS im Tumorgewebe beruht hauptsächlich auf dem Mangel an lymphatischen Gefäßen, welche einen Abtransport des mTHPC aus dem Tumorgewebe ermöglichen würden. Die Photodynamische Therapie mit mTHPC, wie sie bereits an Patienten durchgeführt wird, ist wirksam. Aber die Belastung für die Patienten ist sehr hoch, da sie während und nach der Behandlung vor Licht geschützt werden müssen, bis das mTHPC vollständig ausgeschieden ist.

Aus diesem Grund ist die Untersuchung von mit mTHPC beladenen NP als Wirkstofftransporter der zentrale Punkt des Verbundprojektes.

4.1.4 *In vitro* Voruntersuchungen an den verwendeten Photosensibilisatoren

Um die *in vitro* Experimente an den mit PS beladenen NP beurteilen zu können, wurden zum Vergleich auch die intrazelluläre Aufnahme, die Dunkeltoxizität und die Phototoxizität der PS, appliziert als ethanolische Lösung ohne NP untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.1.4.1 Intrazelluläre Aufnahme der Photosensibilisatoren

Die Ergebnisse der intrazellulären Aufnahme von Pheo, mTHPP und mTHPC in Jurkatzellen nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h Inkubation sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

Alle drei untersuchten PS werden von Jurkatzellen aufgenommen. Die PS Konzentration im Nährmedium beträgt in allen Proben 3 μ M. Die intrazellulären PS-Konzentrationen nach der Inkubation liegen im Bereich von 0,1 mM bis 1,2 mM. Dieser große Konzentrationsunterschied zeigt, dass in allen Proben eine starke Anreicherung der PS in den Zellen stattfindet.

Am geringsten ist die PS-Konzentration in den Pheo-inkubierten Zellen. Die intrazelluläre Pheo-Konzentration steigt kontinuierlich von 0,10 mM \pm 0,01 mM bei 1 h auf 0,38 mM \pm 0,02 mM bei 24 h Inkubation an.

Nach 1 h und 3 h Inkubation ist die intrazelluläre mTHPC-Konzentration (0,70 mM \pm 0,02 mM und 0,16 mM \pm 0,05) der von Pheo-inkubierten Zellen sehr ähnlich.

Die mit mTHPC inkubierten Zellen erreichen jedoch nach 24 h Inkubation eine deutlich höhere intrazelluläre Konzentration (1 mM \pm 0,4 mM) als die mit Pheo inkubierten Zellen.

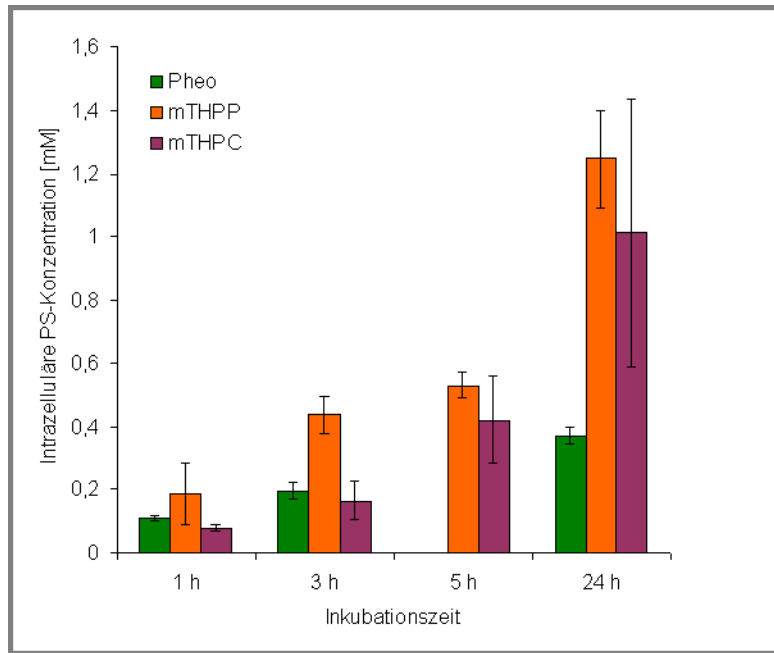


Abbildung 4.3: Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme der untersuchten PS mTHPP und mTHPC nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h Inkubation und Pheo nach 1 h, 3 h und 24 h Inkubation. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen ($n=6$)

Die stärkste intrazelluläre Anreicherung nach allen vier Inkubationszeiten zeigen die mTHPP-inkubierten Zellen. Die intrazelluläre mTHPP-Konzentration steigt kontinuierlich von $0,19 \text{ mM} \pm 0,06 \text{ mM}$ (1 h) auf $1,3 \text{ mM} \pm 0,2 \text{ mM}$ (24 h).

Alle drei PS sind membrangängig und können passiv ohne zellulären Energieaufwand in die Zellen gelangen. Voraussetzung dafür ist, dass die PS als Monomere im Nährmedium vorliegen. Die Affinität der schwer wasserlöslichen PS zu Bestandteilen des Nährmediums ist jedoch hoch.

Besonders mTHPC weist eine starke Affinität zu Albuminen wie bovinem Serumalbumin, welches durch das FBS im Nährmedium in hoher Konzentration vorliegt, auf [117,185]. PS-Moleküle die mit Albuminen assoziiert sind können nicht mehr einfach durch die Membran diffundieren, sondern werden endozytotisch aufgenommen. Die langsame Aufnahmegeschwindigkeit von mTHPC in den ersten 3 h Inkubation ist ein Hinweis auf solch ein Verhalten. Eine Prüfung auf endozytotische Aufnahme von PS und PS-beladenen NP wird in Abschnitt 5.2 beschrieben.

Die schlechte Wasserlöslichkeit der PS bewirkt eine hohe Affinität zu intrazellulären Membranen und anderen intrazellulären Bestandteilen. PS die einmal ins Zytoplasma gelangt sind, reichern sich so in bestimmten Regionen der Zellen an. Aus diesem Grund ist eine starke intrazelluläre Anreicherung, wie hier gemessen, auch bei passiver Aufnahme der PS möglich.

4.1.4.2 Phototoxizität und Dunkeltoxizität der untersuchten Photosensibilisatoren

Die Ergebnisse der Dunkeltoxizitätstests an Pheo, mTHPP und mTHPC sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

Die Totzellraten der 1 h, 3 h, 5 h und 24 h mit Pheo, mTHPP und mTHPC inkubierten Jurkatzellen liegen jeweils zwischen 1 % und 5 %. Auch die Totzellraten der nicht inkubierten Zellen (Ref) liegen in diesem Bereich. Diese Totzellrate ist normal für diesen Zelltyp. Es können in unbestrahlten Jurkatzellen keine toxischen Effekte der PS oder deren Lösemittel Ethanol (EtOH) (0,3 % im Nährmedium) beobachtet werden.

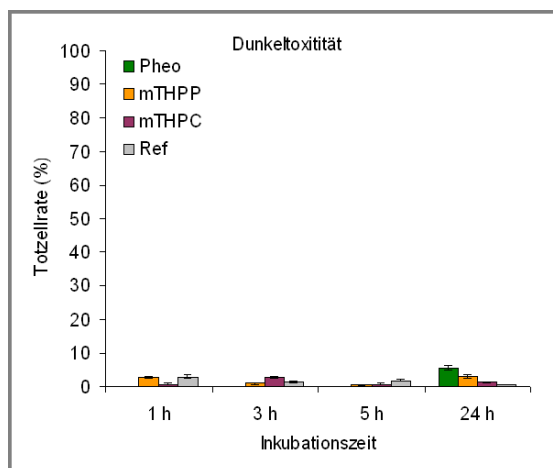


Abbildung 4.4: Dunkeltoxizität von Pheo, mTHPP und mTHPC. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die Ergebnisse der Phototoxizitätstests von mit Pheo, mTHPP und mTHPC inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Hier sind die toten Zellen in apoptotische (links) und nekrotische (rechts) unterschieden worden.

Die Nekroseraten der mit Pheo, mTHPP und mTHPC inkubierten Jurkatzellen liegen alle zwischen 1 % und 5 %. Auch die Nekroseraten der nicht inkubierten Zellen (Ref) liegen in diesem Bereich. Damit liegt die Nekroserate der bestrahlten, photosensibilisierten Jurkatzellen, genau wie die Totzellrate der Dunkeltoxizitätsmessung im normalen Bereich un behandelter Zellen. Es ist keine signifikante Erhöhung der Nekroserate durch die photodynamische Behandlung der Jurkatzellen messbar.

Im Gegensatz dazu ist die Apoptoserate der mit den PS inkubierten Jurkatzellen nach der Bestrahlung deutlich erhöht.

In den mit Pheo inkubierten Jurkatzellen steigt die Apoptoserate mit fortschreitender Inkubationszeit stetig von 14 % \pm 9 % auf 48 % \pm 4 %.

In den mit mTHPP inkubierten Jurkatzellen ist die Apoptoserate nach 1 h Inkubation mit 40 % \pm 10 % schon deutlich höher als die von Pheo. Jedoch bleibt die Apoptoserate hier bis zu 5 h Inkubation konstant, um dann nach 24 h Inkubation auf 18 % \pm 3 % abzufallen.

Die höchste Phototoxizität wird von mTHPC erreicht. Dort ist die Apoptoserate nach 1 h Inkubation schon bei $77\% \pm 8\%$ und steigt nach 5 h Inkubation auf ihr Maximum von $86\% \pm 4\%$. Nach 24 h Inkubation sinkt auch bei mit mTHPC inkubierten Jurkatzellen die Apoptoserate. Mit $60\% \pm 4\%$ ist die von mTHPC verursachte Apoptoserate aber auch nach 24 h immer noch deutlich höher als die von Pheo und mTHPP.

Obwohl die intrazelluläre PS-Konzentration von mTHPP und mTHPC nach 24 h Inkubation deutlich höher ist als nach den kürzeren Inkubationszeiten (siehe Unterunterabschnitt 4.1.4.1, Abbildung 4.3) sinkt hier die Phototoxizität. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Wirkung der PS nicht in erster Linie von einer hohen intrazellulären Konzentration abhängt. Bereits geringe Mengen an Wirkstoff können eine hohe Phototoxizität auslösen.

Für mTHPP und mTHPC konnte in den FLIM-Experimenten eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauern zu kürzeren Zeiten hin beobachtet werden (siehe Unterunterabschnitt 6.1.4.3, Abbildung 6.12 und Abbildung 6.13). Kürzere Fluoreszenzlebensdauern eines PS bedeuten immer auch weniger mögliche Wechselwirkungen mit der Mikroumgebung. Offensichtlich ändert sich die Mikroumgebung der mTHPP- und mTHPC-Moleküle innerhalb des Inkubationszeitintervalls zwischen 5 h und 24 h stark. Diese intrazelluläre Umverteilung der PS hat offensichtlich einen sehr viel stärkeren Einfluss auf die Effizienz der Photosensibilisierung als die intrazelluläre PS-Konzentration.

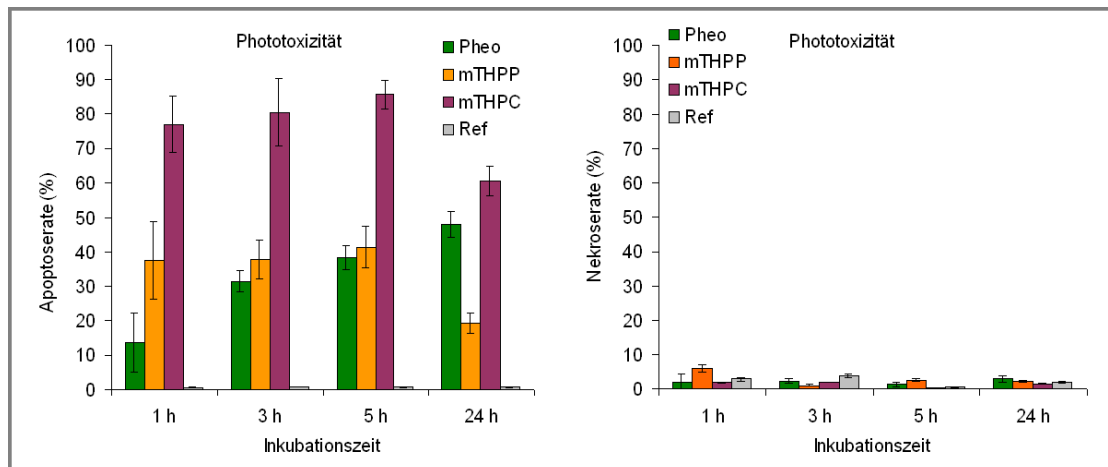


Abbildung 4.5: Die Phototoxizität von Pheo, mTHPP und mTHPC wurde durch Bestimmung der Apoptoserate (links) und der Nekroserate (rechts) ermittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen ($n=6$)

4.1.4.3 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aller Untersuchungen an Pheo, mTHPP und mTHPC

Die in den voran gegangenen Abschnitten detailliert beschriebenen Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen der PS sollen zur Übersicht hier tabellarisch zusammengefasst werden. Die Zusammenfassung beschränkt sich auf die wesentlichen Unterschiede und Gemeinsamkeiten.

PS	Intrazelluläre Konzentration	Aufnahme	Intrazelluläre Verteilung	Phototoxizität
Pheo	gering, (bis 0,4 mM)	durchdringt Zytoplasmamembran	Verteilung im Zytoplasmabereich	mäßig, Apoptoserate bis 48 %, keine signifikante Nekroserate, Maximum nach 24 h
mTHPP	sehr hoch, (bis 1,3 mM)	durchdringt Zytoplasmamembran	Verteilung im Zytoplasmabereich	gering, Apoptoserate bis 40 %, keine signifikante Nekroserate, Maximum nach 5 h
mTHPC	sehr hoch, (bis 1 mM)	endozytotische Aufnahmen durch Wechselwirkungen mit Albuminen	Freisetzung aus Lysosomen nach >1 h Inkubation, Verteilung im Zytoplasmabereich	sehr hoch, Apoptoserate bis 85 %, keine signifikante Nekroserate, Maximum nach 5 h

Tabelle 4.2: Übersicht über die Ergebnisse der *in vitro* Voruntersuchungen an den Photosensibilisatoren Pheo, mTHPP und mTHPC in Jurkatzellen

4.2 Untersuchte Nanopartikel

4.2.1 mTHPC-, mTHPP- und Pheo-beladene HSA-Nanopartikel

Humanes Serumalbumin (HSA) ist das am häufigsten im menschlichen Blutstrom vorkommende humane Protein. Die in dieser Arbeit untersuchten HSA-NP wurden von Matthias Wacker an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main synthetisiert. Die Beladung der NP mit mTHPC und mTHPP wurde von Matthias Wacker durchgeführt. Die Synthese und die Beladung der NP ist in [221] beschrieben.

Für die Untersuchungen an Pheo-beladenen NP wurden von Matthias Wacker unbeladene NP zur Verfügung gestellt, welche von Kuan Chen adsorptiv mit Pheo beladen wurden [37]. Das molekulare Verhältnis von Pheo und HSA beträgt 4:1. Pheo wird als ethanolische Lösung zur NP-Suspension gegeben. Nach der Zugabe wird die Suspension gevortext und anschließend mit Reinstwasser (MilliQ) langsam unter ständigem Rühren verdünnt. Während dieses Prozesses adsorbieren die nicht wasserlöslichen Pheo-Moleküle an die hydrophoben Bereiche des HSA. Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen entsteht ein stabiles PS-NP-System.

Der Durchmesser der HSA-NP beträgt etwa 200 nm. Diese Größe erlaubt die Nutzung des EPR-Effekts (siehe Unterabschnitt 1.3.1) und ermöglicht die endozytische Aufnahme in humane Zellen.

Liste mit den Bezeichnungen und den Beschreibungen der untersuchten HSA-NP sind in Tabelle 4.3 zu sehen.

4.2.2 mTHPP- und mTHPC-beladene PLGA-Nanopartikel

Die in dieser Arbeit untersuchten, mit mTHPC und mTHPP beladenen PLGA-NP wurden von Thomas Knobloch, an der Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt am Main, nach der Emulsions-Diffusions-Methode synthetisiert [111]. Ein Teil der Partikel wurde mit den AK Erb und Immunglobulin G (IgG) modifiziert, die AK wurden mittels PEG an die NP gebunden. Um den Einfluss des PEG auf die Funktionalität der NP gesondert untersuchen zu können sind auch PEG-modifizierte PLGA-NP ohne AK synthetisiert worden.

Für die Beladung der NP mit PS wurden verschiedene Strategien getestet. Eine Strategie ist, erst die NP zu synthetisieren und anschließend diese adsorptiv mit PS zu beladen. Das Resultat sind NP auf deren Oberfläche PS adsorbiert sind.

Eine zweite Strategie ist, die PS bereits während der NP-Synthese dazu zu geben. Auch hier gibt es adsorptive Wechselwirkungen zwischen den PLGA-Polymeren und den PS-Molekülen. Das Resultat sind NP mit inkorporierten PS.

Auch PLGA-NP mit sowohl inkorporiertem als auch außen adsorbierten PS-Molekülen sind synthetisiert worden.

Liste mit den Bezeichnungen und Beschreibungen der verschiedenen untersuchten PLGA-NP sind in den Tabellen 4.4 und 4.5 zu sehen.

Bezeichnung der Probe	Beschreibung
Pheo-HSA	HSA-NP, HSA Monomere quervernetzt mit Glutaraldehydbrücken (GB), NP sind adsorptiv mit Pheo beladen
PHSA40	HSA-NP zu 40 % mit GB gesättigt, Beladungsrate: 19,05 µg/mg Pheo/HSA
PHSA100	HSA-NP zu 100 % mit GB, Beladungsrate: 20,71 µg/mg Pheo/HSA
mTHPC-HSA	HSA-NP, HSA Monomere quervernetzt mit GB, NP sind adsorptiv mit mTHPC beladen
mTHPC-HSA40	HSA-NP zu 40 % mit GB gesättigt, Beladungsrate: 19,05 µg/mg mTHPC/HSA
mTHPC-HSA100	HSA-NP zu 100 % mit GB, Beladungsrate: 20,71 µg/mg mTHPC/HSA
mTHPC-HSA200	HSA-NP zu 200 % mit GB, Beladungsrate: 20,59 µg/mg mTHPC/HSA
18mTHPC-HSA100	HSA-NP zu 100 % mit GB, Beladungsrate: 18,47 µg/mg mTHPC/HSA
31mTHPC-HSA100	HSA-NP zu 100 % mit GB, Beladungsrate: 31,51 µg/mg mTHPC/HSA
mTHPP-HSA	HSA-NP, HSA Monomere quervernetzt mit GB, NP sind adsorptiv mit mTHPP beladen
22mTHPP-HSA100	HSA-NP zu 100 % mit GB, Beladungsrate: 22,50 µg/mg mTHPP/HSA
20mTHPP-HSA100	HSA-NP zu 100 % mit GB, Beladungsrate: 20,50 µg/mg mTHPP/HSA

Tabelle 4.3: Liste der untersuchten HSA-NP

Bezeichnung der Probe	Beschreibung
mTHPC-PLGA	
mTHPC-PLGA ^a	PLGA-NP, Beladungsrate: 20 µg/mg mTHPC/PLGA, die NP sind adsorptiv mit mTHPC beladen
mTHPC-PLGA ⁱ	PLGA-NP, Beladungsrate: 18 µg/mg mTHPC/PLGA, die NP sind inkorporativ mit mTHPC beladen
mTHPC-PLGA ^{ia}	PLGA-NP, Beladungsrate: 32 µg/mg mTHPC/PLGA, die NP sind sowohl in- korporativ als auch adsorptiv mit mTHPC beladen
mTHPP-PLGA	
mTHPP-PLGA	PLGA-NP, Beladungsrate: 21 µg/mg mTHPP/PLGA, die NP sind inkorporativ mit mTHPP beladen

Tabelle 4.4: Liste der untersuchten unmodifizierten PLGA-NP

Bezeichnung der Probe	Beschreibung
mTHPC-PLGA-PEG	PLGA-NP, adsorptiv mit mTHPC beladen und mit PEG modifiziert. Beladungsrate: 14,7 µg/mg
mTHPC-PLGA-IgG	PLGA-NP, adsorptiv mit mTHPC beladen und mit PEG und dem AK Immunglobulin G (IgG) modifiziert. Beladungsrate: 14,8 µg/mg
mTHPC-PLGA-Erb	PLGA-NP, adsorptiv mit mTHPC beladen und mit PEG und dem AK Erbitux (Erb) modifiziert. Beladungsrate: 14,7 µg/mg

Tabelle 4.5: Liste der untersuchten modifizierten PLGA-NP

5 Entwicklung eines Routineverfahrens zur Untersuchung von photoaktiven NP *in vitro* anhand des Modells Pheo-HSA

Im Rahmen des Verbundprojektes wurden verschiedene biodegradierbare mit PS beladene NP entwickelt und synthetisiert, die *in vitro* untersucht wurden. Zu Beginn der Untersuchungen stand die Aufgabe ein Routineverfahren zu entwickeln, welches eine standardisierte Beurteilung der NP-PS-Formulierungen ermöglicht.

Erste orientierende Untersuchungen dazu wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit [161] durchgeführt. Die Ausarbeitung der vollständigen Abfolge der Experimente für die Evaluierung von NP als mögliche Wirkstofftransporter, erfolgte in der ersten Phase der Promotion. Die hierbei etablierten Versuchsbedingungen dienten im Weiteren als Standard für die im Verbundprojekt *NanoCancer* durchgeführten *in vitro* Versuche.

Dieses Routineverfahren wurde anhand von HSA40- und HSA100-NP [113] entwickelt die in unserer Arbeitsgruppe von Kuan Chen mit Pheo beladen wurden. Pheo wurde ausgewählt, weil dieser PS in unserer Arbeitsgruppe bereits sehr gut untersucht wurde, seine photophysikalischen Eigenschaften sind gut bekannt.

Anhand der in den folgenden Abschnitten beschriebenen Ergebnisse wurde festgelegt, mit welchen Methoden weitere NP-PS-Formulierungen *in vitro* untersucht wurden.

Schwerpunkte der Untersuchungen waren die Quantifizierung der intrazellulären NP-PS-Aufnahme und die Bestimmung deren Phototoxizität. Um die intrazelluläre PS-Verteilung, den Abbau der NP und die intrazelluläre Freisetzung der PS beobachten zu können, wurden CLSM- und FLIM-Experimente etabliert.

5.1 Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mittels Nanopartikeln transportierten Photosensibilisatoren

Die intrazelluläre Aufnahme der PS ist eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente Photosensibilisierung der Zellen. Zur Charakterisierung sowohl der PS selbst, als auch der nanopartikulären Transportsysteme ist die PS-Konzentration in Jurkatzellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bestimmt worden (Durchführung siehe Unterabschnitt 3.3.1).

CLSM-Experimente (siehe Abschnitt 5.2) belegen, dass die mit den Zellen assoziierten PS-Moleküle im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert sind. In keiner Probe konnten PS assoziiert mit der Zytoplasmamembran ausserhalb der Zellen gefunden werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei der im Folgenden beschriebenen Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme der PS und NP ausschließlich intrazellulär lokalisierte PS bestimmt werden.

5.1.1 Intrazelluläre Aufnahme von mit Pheo beladenen HSA-Nanopartikeln

Die NP PHSA40 und PHSA100 wurden von den Jurkatzellen aufgenommen. Die durch Aufnahme der NP erreichten intrazellulären Pheo-Konzentrationen sind im Vergleich zu denen von mit Pheo inkubierten (ohne NP) Zellen in Abbildung 5.1 dargestellt.

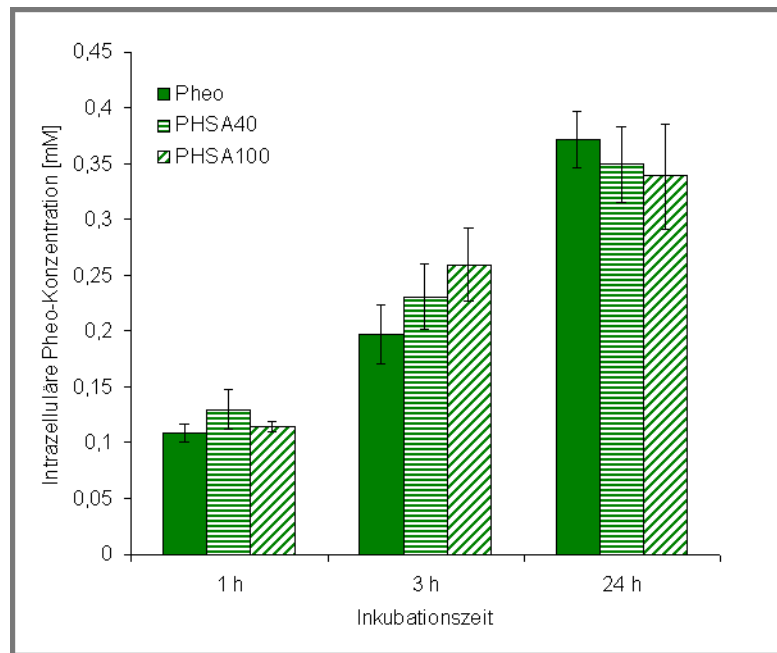


Abbildung 5.1: Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von Pheo, PHSA40 und PHSA100 Inkubation. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Im Vergleich zu mit Pheo inkubierten Zellen ist in den mit PHSA40 und PHSA100 inkubierten Zellen kein signifikanter Unterschied in der intrazellulären Pheo-Konzentration messbar. Die Effizienz der Pheo-Anreicherung im Zytoplasma ist bei Nutzung der nanopartikulären Formulierungen PHSA40 und PHSA100 gegenüber freiem Pheo weder eingeschränkt noch verbessert.

PHSA40 und PHSA100 können aufgrund ihrer Größe (ca. 200 nm) ausschließlich mittels Endozytose in humane Zellen aufgenommen werden. Daher ist dieses Ergebnis bereits ein wichtiger Hinweis auf die Biokompatibilität der HSA-NP. Sie werden von der Zelle offenbar als Nahrung erkannt und aufgenommen. Auf das Wachstum der im Dunkeln inkubierten Zellen haben weder das Pheo noch PHSA40 oder PHSA100 einen signifikanten Einfluss.

5.2 Nachweis der endozytotischen Aufnahme der Photosensibilisator beladenen Nanopartikel mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie

Im folgenden Abschnitt sind die Untersuchungen dargestellt, welche an verschiedenen HSA-NP mittels CLSM durchgeführt wurden.

Die erste wichtige Fragestellung dieser Untersuchungen war, zu prüfen, ob die PS wirklich intrazellulär angereichert wurden. Mit der Methode der Quantifizierung der PS (siehe Unterabschnitt 3.3.1) ist es nicht möglich zwischen intrazellulärer Konzentration und der Menge von lediglich aussen mit der Zytoplasmamembran assoziierten PS zu unterscheiden. Deshalb ist es wichtig mit einer unabhängigen Methode nachzuweisen, dass die gemessenen PS-Konzentrationen wirklich aus dem Bereich des Zytoplasmas stammen. Dies ist dank der konfokalen Auflösung des CLSM mit den im Folgenden beschriebenen Versuchen möglich.

Die zweite wichtige Frage, die mit diesen Versuchen beantwortet wurde bezieht sich auf die Stabilität der PS-beladenen NP. Die hier untersuchten NP können nur durch Endozytose aufgenommen werden.

Die endozytotisch aufgenommenen PS müssen mindestens am Anfang der Inkubationszeit in Endosomen und Lysosomen lokalisiert sein, dies wurde mit Hilfe des für diese Organellen spezifischen Markers LysoSensor green untersucht. PS die auf nicht-endozytotischem Weg in die Zellen gelangen, können nicht in Verbindung mit NP transportiert worden sein. Deshalb liefert der Nachweis der endozytotischen Aufnahme der PS einen wichtigen Hinweis über die Stabilität der nanopartikulären Transportsysteme.

Für die Effizienz der Photosensibilisierung ist nicht nur die Aufnahme der NP in die Zellen wichtig, sondern auch die anschließende Freisetzung der PS von den NP. Auch die Freisetzung der PS aus den Lysosomen und ihre Verteilung im Zytoplasmaraum ist mit Hilfe des LysoSensor green sichtbar (siehe nächster Abschnitt).

5.2.1 Endozytotische Aufnahme von mit Pheo beladenen HSA-Nanopartikeln, Nachweis mittels Konfokaler Laserscanningmikroskopie

Die Ergebnisse der CLSM-Messungen an mit Pheo, PHSA40 und PHSA100 inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 5.2 dargestellt. In rot ist die Fluoreszenz des Pheo und in grün die des LysoSensor green zu sehen. Gelbe Bildpunkte entstehen durch die Überlagerung von roten und grünen Bildpunkten und belegen die Lokalisation von Pheo in Endosomen und Lysosomen.

Die Messung zeigt, dass die PS in allen Proben innerhalb der Zellen, im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert sind. Im Bereich des Zellkerns sind keine PS zu finden. Das spricht dafür, dass die Jurkatzellen zum Zeitpunkt der Messung vital und intakt sind.

In den nur mit Pheo inkubierten Zellen unterscheiden sich die Verteilungsmuster der Endosomen und Lysosomen (grün) zu allen Inkubationszeiten stark von denen der Pheo-Moleküle (rot). Hier liegt also keine endozytotische Aufnahme vor. Die Pheo-Moleküle sind in der Lage, die Zytoplasmamembran und intrazelluläre Membranen -die Kernmembranen

ausgenommen- zu penetrieren.

Im Kontrast dazu ist bereits nach 1 h Inkubation mit PHSA40 und PHSA100 in den Jurkatzellen eine starke Kolokalisation von Pheo und Lysosensor green zu beobachten. In den mit PHSA100 inkubierten Jurkatzellen ist auch nach 5 h Inkubation noch eine teilweise Kolokalisation zu erkennen. Nach 24 h ist jedoch sowohl für die mit PHSA40 also auch mit PHSA100 inkubierten Jurkatzellen keine Kolokalisation von Pheo und Lysosensor green mehr zu beobachten.

Aus diesen Untersuchungen folgt, dass die NP PHSA40 und PHSA100 endozytotisch, als komplettes PS-NP-System aufgenommen werden. Innerhalb der Lysosomen werden die Pheo-Moleküle freigesetzt und können sich im Zytoplasma verteilen. Die Freisetzung scheint für PHSA40 schneller vonstatten zu gehen (<5 h) als für PHSA100 (>5 h). Grund für den längeren Freisetzungsprozess könnte die stärkere GB-Vernetzung der HSA-Moleküle in den PHSA100-NP verglichen mit den PHSA40-NP sein.

5.3 Nachweis des lysosomalen Abbaus der Nanopartikel und der folgenden intrazellulären Freisetzung der Photosensibilisatoren

Damit die endozytotisch mittels NP aufgenommenen PS in den Lysosomen freigesetzt werden können, müssen die NP abgebaut werden. Die in dieser Arbeit untersuchten HSA-NP sind biodegradierbar. Die saure Umgebung und die hohe Konzentration katabolischer Enzyme in den Lysosomen sollte den Abbau der NP ermöglichen. Dieser Prozess wird über die während der Freisetzung stattfindende Änderung der Fluoreszenzlebensdauer der PS mittels FLIM verfolgt (Durchführung siehe Unterabschnitt 3.3.3).

5.3.1 Lysosomaler Abbau der Pheo-HSA Nanopartikel und intrazelluläre Freisetzung von Pheo, Nachweis mittels Fluoreszenz Lifetime Imaging

Die FLIM-Bilder und die dazugehörigen Histogramme zur Darstellung der Häufigkeit der in den Bildern gemessenen Fluoreszenzlebensdauern der mit Pheo, PHSA40 und PHSA100 inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 5.3 dargestellt.

In den Bildern sind die in jedem Pixel gemessenen Fluoreszenzlebensdauern farbcodiert dargestellt (siehe Farbskala, rechts).

Um die mit PHSA40 und PHSA100 inkubierten Zellen vergleichen zu können sind auch mit Pheo (ohne NP) inkubierte Zellen untersucht worden. Sowohl in den Bildern als auch im Histogramm (unten, links) der mit Pheo inkubierten Jurkatzellen lässt sich keine signifikante Änderung der Fluoreszenzlebensdauer über die verschiedenen Inkubationszeiten nachweisen. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer zu allen Inkubationszeiten liegt zwischen 5,9 ns und 6,0 ns. Dieses Ergebnis bestätigt die CLSM-Messung welche bereits zeigte, dass bei der Inkubation mit freiem Pheo keine Endozytose stattfindet. Die Pheo-Moleküle liegen sowohl vor, als auch nach der passiven Aufnahme durch die Zellen als Monomere vor. Die Diffusion der Pheo-Moleküle durch die Zytoplasmamembran beeinflusst die Fluoreszenzlebensdauer nicht.

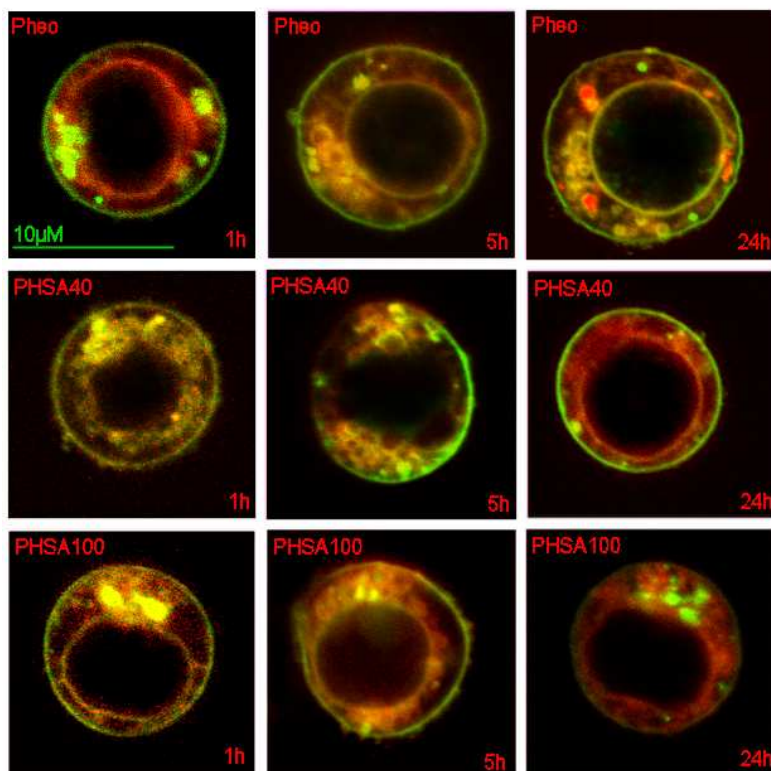


Abbildung 5.2: CLSM-Bilder von Jurkatzellen 1 h, 5 h und 24 h inkubiert mit Pheo, PHSA40 und PHSA100. Die Endosomen und Lysosomen der Zellen wurden mit LysoSensor green markiert (grüne Fluoreszenz), die rote Fluoreszenz stammt von Pheo. Gelbe Signale charakterisieren die Kollokalisierung von Pheo und LysoSensor green. Anregungswellenlänge für beide Farbstoffe: $\lambda_{ex} = 405$ nm. Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt (n=4).

Im Vergleich dazu ändert sich die Fluoreszenzlebensdauer des mittels PHSA40- und PHSA100-endozytotisch in die Zellen transportierten Pheo zwischen 1 h und 3 h Inkubation. Nach 1 h Inkubation beträgt die mittlere Fluoreszenzlebensdauer des Pheo sowohl für PHSA40, als auch für PHSA100 6,2 ns. Nach 3 h, 5 h und 24 h Inkubation fällt die Fluoreszenzlebensdauer sowohl für PHSA40, als auch für PHSA100 auf 5,9 ns bis 6,0 ns ab (siehe Verschiebung der Histogramme, Abbildung 5.3, unten). Bereits nach 3 h sind die HSA-NP soweit abgebaut, dass die Pheo-Moleküle monomer vorliegen, nach dieser Inkubationszeit sind die Fluoreszenzlebensdauern des Pheo in PHSA40- und PHSA100-inkubierten Jurkatzellen nicht mehr von den mit Pheo inkubierten zu unterscheiden.

Voran gegangene photophysikalische Untersuchungen an den mit Pheo beladenen HSA-NP, bestätigen die Freisetzung der Pheo-Moleküle von den NP innerhalb der Jurkatzellen (siehe Tabelle 4).

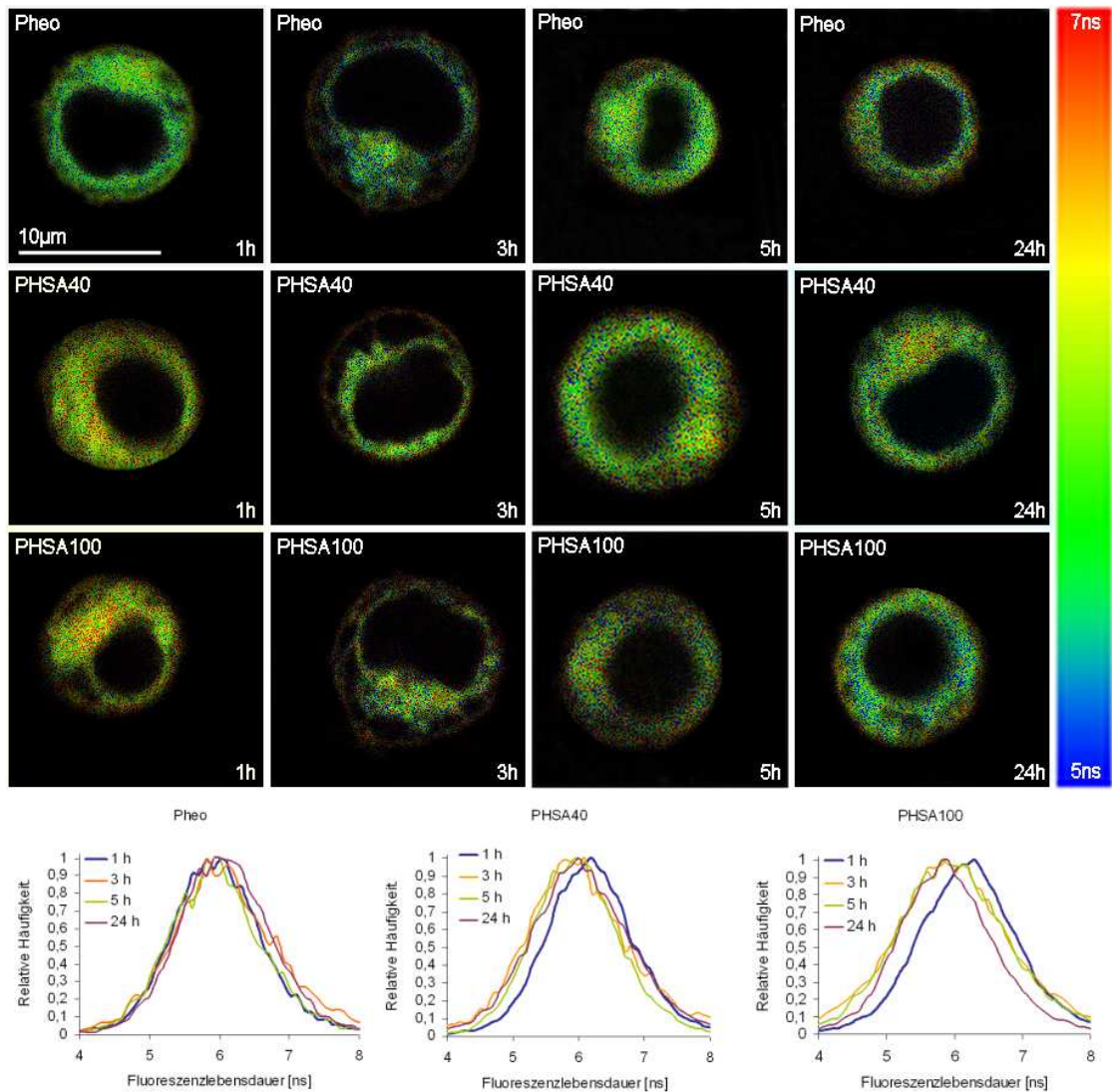


Abbildung 5.3: FLIM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit Pheo, PHSA40 und PHSA100. Fluoreszenzanregung mit einem gepulsten ns-Laser ($\lambda_{ex} = 440$ nm). Die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern jedes Pixels sind farbcodiert dargestellt (siehe Farbskala). Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$). Die Histogramme (unten) zeigen die relative Häufigkeit der in je 4 verschiedenen Zellen gemessenen Fluoreszenzlebensdauern.

5.4 Überprüfung der Photo- und Dunkeltoxizität

Um die Effizienz der nanopartikulären PS-HSA-Systeme zu testen, wurde deren Phototoxizität untersucht. Um zu überprüfen ob die gemessenen zytotoxischen Effekte wirklich

auf photodynamischen Prozessen beruhen, wurden alle Proben auch auf Dunkeltoxizität getestet. (Die Durchführung dieser Experimente ist in Unterabschnitt 3.3.4 dargestellt.)

Die Dunkel- und Phototoxizitätsmessungen der PS selbst und der PS beladenen HSA-NP im Vergleich werden in den nächsten Abschnitten beschrieben.

5.4.1 Phototoxizität und Dunkeltoxizität von mit Pheo beladenen HSA-Nanopartikeln

Um die Effizienz der Photosensibilisierung durch biodegradierbare mit PS beladene NP beurteilen zu können ist es nötig deren Phototoxizität zu bestimmen. Ebenso wichtig ist es zu prüfen, dass keine Dunkeltoxizität von den mit PS beladenen NP verursacht wird.

In einem ersten Dunkeltoxizitätstest wurde untersucht welchen Einfluss verschiedene Konzentrationen von Pheo beziehungsweise EtOH auf die Jurkatzellen haben. Diese Messung war Grundlage für die Festlegung der PS-Konzentration und der maximalen EtOH-Konzentration im Nährmedium für alle folgenden Experimente.

Um einen toxischen, nicht phototoxischen Effekt, ausgehend von den mit Pheo beladenen und den unbeladenen HSA-NP auszuschließen wurden auch die Proben PHSA40, PHSA100, HSA40 und HSA100 auf ihre Dunkeltoxizität getestet.

Die Ergebnisse der Dunkeltoxizitätsmessung sind in Abbildung 5.4 dargestellt.

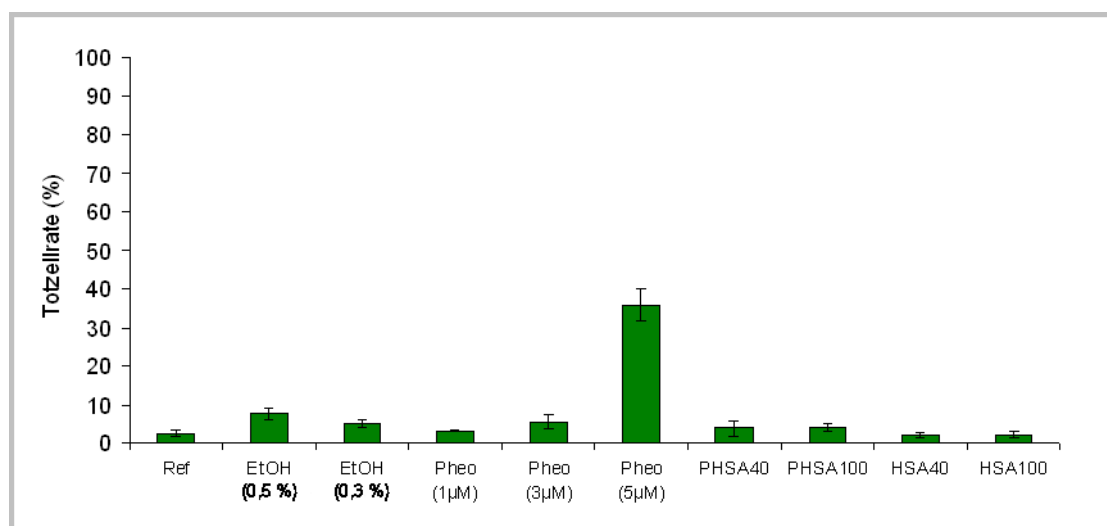


Abbildung 5.4: Dunkeltoxizität von Pheo, PHSA40, PHSA100, HSA40, HSA100 und Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses (EtOH) nach 24 h Inkubation. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die Totzellrate der mit 1 µM Pheo, 3 µM Pheo, 0,3 % EtOH, PHSA40, PHSA100 und der nicht mit PS beladenen NP HSA40 und HSA100 liegt unter 5 % und damit im normalen Bereich. Weder die HSA-NP selbst noch die Pheo beladenen HSA-NP zeigen eine toxische Wirkung auf unbestrahlte Jurkatzellen. Nur die Proben 5 µM Pheo (Totzellrate 36 % ± 5 %) und 0,5 % EtOH (Totzellrate 8 % ± 2 %) zeigen eine erhöhte

Dunkeltoxizität, deshalb sind für weitere Zellexperimente PS-Konzentrationen über 3 μM und EtOH-Konzentrationen über 0,3 % ausgeschlossen worden.

Die Ergebnisse der Phototoxizitätstests an mit PHSA40 und PHSA100 inkubierten im Vergleich zu mit Pheo inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Hier sind die toten Zellen in apoptotische (links) und nekrotische (rechts) unterschieden worden.

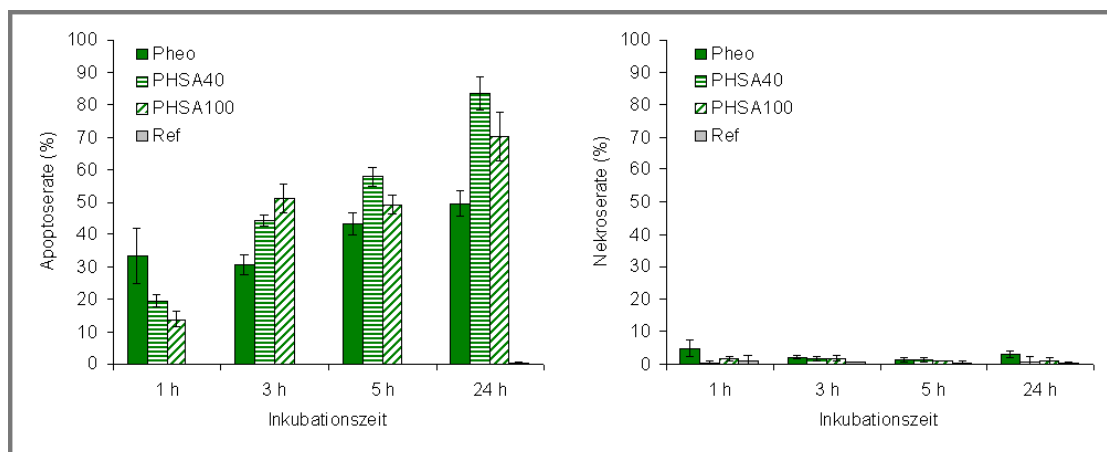


Abbildung 5.5: Die Phototoxizität von Pheo, PHSA40 und PHSA100 wurde durch Ermittlung der Apoptoserate (links) und der Nekroserate (rechts) bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen ($n=6$)

Auch für die mit PHSA40 und PHSA100 inkubierten und bestrahlten Jurkatzellen konnte keine signifikant erhöhte ($>5\%$) Nekroserate beobachtet werden.

Die Apoptoserate in mit PHSA40 und PHSA100 inkubierten Jurkatzellen ist zu allen Inkubationszeiten deutlich erhöht und steigt mit fortschreitender Inkubationszeit deutlich.

Nach 1 h Inkubationszeit ist die Apoptoserate für PHSA40 ($20\% \pm 3\%$) und PHSA100 ($14\% \pm 3\%$) geringer als für Pheo (ohne NP). Aber bereits nach 3 h Inkubation ist die Apoptoserate für PHSA40 ($44\% \pm 2\%$) und PHSA100 ($51\% \pm 4\%$) signifikant höher als die für Pheo (ohne NP).

Diese erhöhte Phototoxizität von PHSA40 und PHSA100 ist besonders deutlich nach 24 h Inkubation. Nach dieser Inkubationszeit werden für die mit PHSA40 und PHSA100 inkubierten und bestrahlten Jurkatzellen Apoptoseraten von $83\% \pm 5\%$ (PHSA40) und $70\% \pm 7\%$ (PHSA100) erreicht.

Die intrazelluläre Pheo-Konzentration nach der Inkubation von Jurkatzellen mit PHSA40 und PHSA100 unterscheidet sich nicht signifikant von der mit Pheo (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen (siehe Unterabschnitt 5.1.1 und Abbildung 5.1).

Die Effizienz der Photosensibilisierung mit PHSA40 und PHSA100 ist dennoch höher als die von freiem Pheo (ohne NP). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass für eine effektive Photosensibilisierung der Zellen, die intrazelluläre Verteilung der PS eine größere Rolle spielt als die intrazelluläre Pheo Konzentration.

5.4 Überprüfung der Photo- und Dunkeltoxizität

Dieser Arbeit voran gegangene photophysikalische Untersuchungen an PHSA40 und PHSA100 zeigen, dass die Pheo Moleküle auf den NP stark mit einander wechselwirken, was die Fähigkeit zur 1O_2 -Generierung deutlich reduziert (siehe Abschnitt 1, Tabelle 4). Erst durch intrazelluläre Freisetzung monomerisiertes Pheo kann effizient 1O_2 generieren. Dies spiegelt sich deutlich in der anfangs geringen, und mit fortschreitender Inkubationszeit ansteigenden Phototoxizitäten wieder.

5.5 Zusammenfassung der Untersuchungen an Pheo-beladenen HSA-Nanopartikeln

In den voran gegangenen Abschnitten dieses Kapitels wurden die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen an Pheo-beladenen HSA-NP beschrieben. Es wurde nachgewiesen, dass alle untersuchten Pheo-HSA-NP-Systeme Pheo in Jurkatzellen transportieren, diese dort anreichern und nach Bestrahlung Zelltodmechanismen auslösen können.

Die photodynamische Aktivität von Pheo ist bekannt. Hier konnte die Phototoxizität von Pheo nach Applikation mit HSA-NP nachgewiesen werden. Durch die Verwendung der HSA-NP wird nach 24 h Inkubation sogar eine höhere Phototoxizität erreicht als durch die Verwendung von Pheo ohne NP. Der Grund hierfür ist nicht in einer höheren intrazellulären Pheo-Konzentration, sondern in einer für die Effizienz der Photosensibilisierung günstigeren Verteilung der Pheo-Moleküle. Diese Verteilung wird durch die endozytotische Aufnahme der NP und die anschließende Freisetzung der PS aus den Lysosomen erreicht.

Das Ziel der Untersuchungen an den mit Pheo beladenen HSA-NP war es, einen Versuchsablauf zu etablieren der es ermöglicht, biodegradierbare mit PS beladene NP auf ihre Eignung als Wirkstofftransporter hin *in vitro* zu prüfen und zu vergleichen.

Aufgrund der unter Nutzung von Pheo durchgeführten Experimente konnten für alle weiteren Experimente die folgenden Parameter festgelegt werden:

Die PS-Konzentration im Nährmedium der Jurkatzellen beträgt 3 μM unabhängig davon ob die PS als ethanolische Lösung oder in Verbindung mit NP zugesetzt werden. Der Ethanolgehalt im Nährmedium beträgt maximal 0,3 %, diese Konzentration beeinflusst die Jurkatzellen nicht.

Sowohl Aufnahme als auch Freisetzung der PS und der NP erfolgt innerhalb der ersten 24 h der Inkubation. Deshalb werden die Inkubationszeiten für alle Experimente auf 1 h, 3 h, 5 h und 24 h festgesetzt.

Folgende Untersuchungsmethoden haben sich als geeignet erwiesen, die PS-NP-Systeme als Wirkstofftransporter zu charakterisieren:

Zur Untersuchung der intrazellulären Aufnahme wird die Fluoreszenz im ethanolischen Zellextrakt quantifiziert. Um zu prüfen, dass mit dieser Methode ausschließlich intrazelluläre PS-Moleküle gemessen werden, wird zusätzlich mittels CLSM geprüft ob sich ausserhalb der Zellen mit der Zytoplasmamembran assoziierte PS befinden.

Im Gegensatz zu den membrangängigen Pheo-Molekülen müssen HSA-NP mittels Endozytose aufgenommen werden. Der Endozytosenachweis ist daher als ein wichtiger Hinweis auf die Stabilität der PS-NP-Systeme zu werten. Der Nachweis erfolgt mittels CLSM. Für diese Untersuchung werden die Endosomen und Lysosomen der Jurkatzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoSensorGreen markiert. Sowohl die Fluoreszenz des LysoSensorGreen, als auch die Fluoreszenz des PS werden aufgenommen und im Überlagerungsbild ausgewertet. Diese Methode liefert nicht nur eine Aussage über die Stabilität der PS-NP-Systeme, sondern auch über die Freisetzung der PS-Moleküle aus den Lysosomen, welche Voraussetzung für eine effiziente Photosensibilisierung der Zellen ist.

5.5 Zusammenfassung der Untersuchungen an Pheo-beladenen HSA-Nanopartikeln

Die PS-Moleküle können erst aus den Lysosomen freigesetzt werden, nachdem die NP, an welche sie gekoppelt sind, abgebaut sind. Um den Abbau der biodegradierbaren NP innerhalb der Lysosomen beobachten zu können, wurden FLIM-Experimente durchgeführt. Hierbei wird ausgenutzt, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer der PS-Moleküle in Abhängigkeit von der Mikroumgebung ändert.

Zur Bestimmung der photodynamischen Wirksamkeit wurden *in vitro* Untersuchungen zur Phototoxizität und Dunkeltoxizität der PS-NP-Systeme durchgeführt. Die Apoptose- und Nekroseraten von Jurkatzellen lassen sich durch Auszählen mittels Zählkammer und Lichtmikroskop, nach einer Vitalfärbung mit Trypanblau bestimmen.

Das Ziel eine sinnvolle Kombination von Methoden zur *in vitro* Untersuchung von biodegradierbaren PS-NP-Systemen zu etablieren wurde anhand der Experimente an Pheo-HSA-NP erreicht. Die hier etablierten Versuchsabläufe wurden im Folgenden verwendet um verschiedene mTHPP- und mTHPC beladene HSA- und PLGA-NP *in vitro* zu untersuchen.

6 HSA-Nanopartikel als Transportsysteme für Wirkstoffe in der Photodynamischen Therapie

6.1 Bestimmung des optimalen PS-HSA-Nanopartikelsystems

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse von Untersuchungen an mit mTHPP und mTHPC beladenen HSA-NP beschrieben.

Verschiedene Parameter der Präparation der HSA-NP wurden variiert. Diese Variationen wurden auf ihre intrazelluläre Aufnahme und Phototoxizität hin geprüft.

Die erste hier untersuchte Variation betrifft die Stabilisierung der HSA-Aggregate vor deren Vernetzung durch GB zu soliden NP. Hierfür werden verschiedene Konzentrationen an HSA-Monomeren in der Suspension ausprobiert. Diese Variationen werden in Abschnitt 6.1.1 untersucht.

Der zweite variierte Parameter ist die Vernetzung durch GB. Dazu können die HSA-Aggregate mit GB gesättigt werden (100% Vernetzung), übersättigt (200% Vernetzung) oder mit einem Unterschuss an GB vernetzt werden (40% Vernetzung). Diese Variationen werden in Abschnitt 6.1.2 untersucht.

Variiert werden nicht nur die Syntheseparameter der HSA-NP, sondern auch die Beladungsrate mit PS. Diese Variationen werden in Abschnitt 6.1.3 untersucht.

Nachdem aus diesen Untersuchungen die optimale Variation ermittelt wurde, wurden diese HSA-NP beladen mit mTHPP und mTHPC genauer untersucht. Mittels CLSM wurde die endozytotische Aufnahme der NP und die Freisetzung der PS aus den Lysosomen beobachtet. Mittels FLIM wurde der Abbau der NP in den Lysosomen und die Freisetzung der PS von den NP untersucht (siehe Abschnitt 6.1.4).

6.1.1 Präparation der Nanopartikel

Die NP-Proben für die folgende Untersuchung sind HSA-NP die aus 100% mit GB quervernetzten HSA-Monomeren synthetisiert wurden. Im Verlauf der Synthese wurden vor Zugabe des Glutaraldehyds die HSA-Aggregate mit Hilfe unterschiedlicher Konzentrationen (0,75 mM und 2,00 mM) von HSA-Monomeren in der Suspension stabilisiert. Es wurden beide Proben untersucht um zu prüfen, ob dieses Verfahren einen Einfluss auf die Funktionalität der Partikel hat.

6.1.1.1 Intrazelluläre Aufnahme von mit mTHPP beladenen HSA-Nanopartikeln

Die durch Aufnahme der NP erreichten intrazellulären mTHPP-Konzentrationen im Vergleich zu denen von mTHPP-inkubierten (ohne NP) Zellen sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

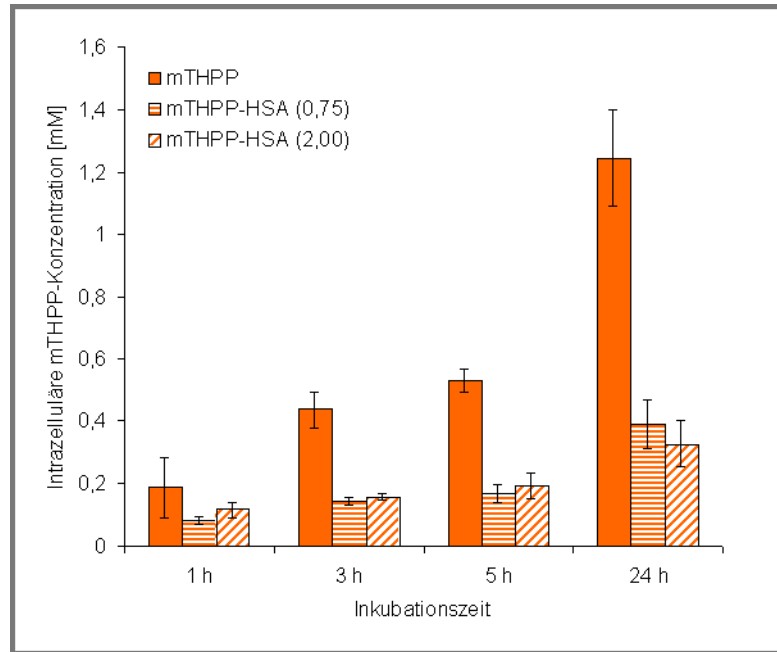


Abbildung 6.1: Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPP, mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00). Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Sowohl die Inkubation mit mTHPP-HSA(0,75) als auch die mit mTHPP-HSA(2,00) führt zu einer Anreicherung von mTHPP in den Jurkatzellen. Die erreichten intrazellulären mTHPP-Konzentrationen sind jedoch signifikant geringer als die in mTHPP-inkubierten (ohne NP) Jurkatzellen. Die endozytotische Aufnahme der mTHPP-beladenen HSA-NP ist deutlich ineffizienter als die passive intrazelluläre Anreicherung von mTHPP direkt über die Zytoplasmamembran.

Die intrazelluläre mTHPP-Konzentration in den mit mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00) inkubierten Zellen steigt kontinuierlich etwa von 0,1 mM (1 h) auf 0,3 mM (24 h). Im Vergleich dazu kann mit freiem mTHPP eine etwa vierfach höhere intrazelluläre Konzentration erreicht werden (etwa 1,3 mM).

Ein signifikanter Unterschied in der Aufnahme von mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00) ist nicht vorhanden.

6.1.1.2 Photo- und Dunkeltoxizität von mTHPP beladenen HSA-Nanopartikeln

Die Ergebnisse der Dunkeltoxizitätsmessung an 1 h, 3 h, 5 h und 24 h mit mTHPP-HSA(0,75), mTHPP-HSA(0,75) inkubierten Jurkatzellen im Vergleich mTHPP (ohne NP) sind in Abbildung 6.2 dargestellt.

Die Totzellrate der 1 h, 3 h, 5 h und 24 h mit mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00) beladenen NP liegt unter 5 % und damit im normalen Bereich. mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00) zeigen keine toxische Wirkung auf unbestrahlte Jurkatzellen.

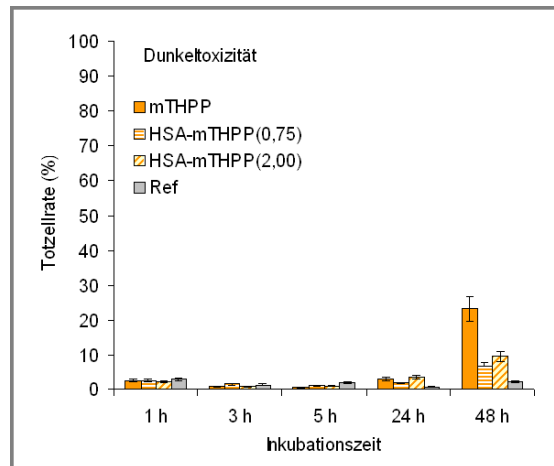


Abbildung 6.2: Dunkeltoxizität von mTHPP, mTHPP-HSA(0,75), mTHPP-HSA(0,75) und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h Inkubation. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die Ergebnisse der Phototoxizitätsmessung an 1 h, 3 h, 5 h und 24 h mit mTHPP-HSA(0,75), mTHPP-HSA(0,75) inkubierten Jurkatzellen im Vergleich mTHPP (ohne NP) sind in Abbildung 6.3 dargestellt.

Auch für die mit mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00) inkubierten und bestrahlten Jurkatzellen konnte keine signifikant erhöhte (>5 %) Nekroserate beobachtet werden.

Die Apoptoserate in mit mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00) inkubierten Jurkatzellen ist zu allen Inkubationszeiten erhöht. Verglichen mit der schon nicht besonders hohen Phototoxizität von mTHPP ist die Phototoxizität von mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00) noch deutlich geringer.

Nach 1 h Inkubation ist dieser Unterschied mit $32 \% \pm 5 \%$ (mTHPP-HSA(0,75)) und $31 \% \pm 5 \%$ (mTHPP-HSA(2,00)) im Vergleich zu $38 \% \pm 11 \%$ (mTHPP) noch nicht signifikant.

Nach 3 h Inkubation wird dieser Unterschied mit $6 \% \pm 1 \%$ (mTHPP-HSA(0,75)) und $6 \% \pm 1 \%$ (mTHPP-HSA(2,00)) im Vergleich zu $38 \% \pm 6 \%$ (mTHPP) jedoch

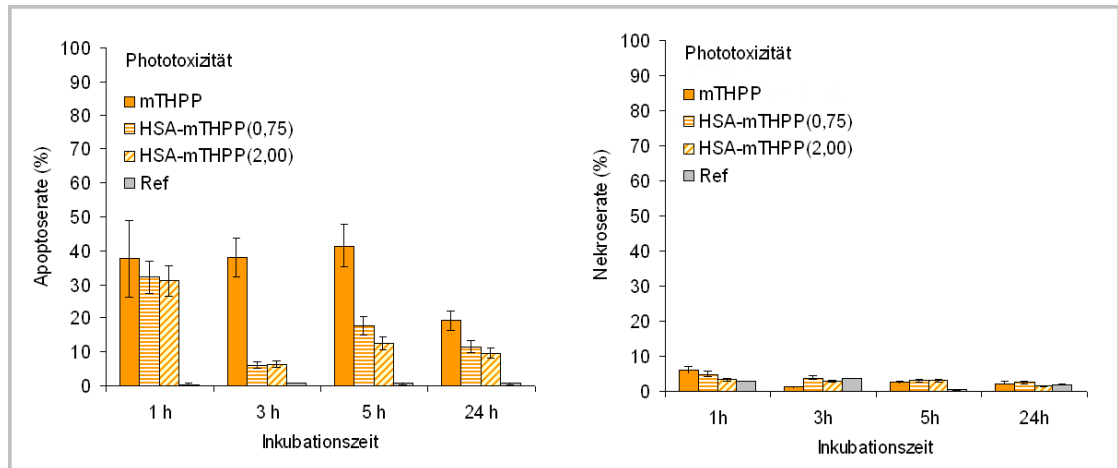


Abbildung 6.3: Phototoxizität von mTHPP, mTHPP-HSA(0,75), mTHPP-HSA(2,00) und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h Inkubation. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

schon sehr deutlich. Auch nach 5 h und 24 h Inkubation liegt die Apoptoserate von mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00) deutlich unter der von mTHPP.

Sowohl die endozytotische Aufnahme, als auch der lysosomale Abbau und die damit verbundene Freisetzung von mTHPP sind für die adsorptiv mit mTHPP beladenen HSA-NP stark verlangsamt (siehe Unterunterabschnitt 6.1.4.1 und Unterunterabschnitt 6.1.4.3). In den photophysikalischen Untersuchungen von Kuan Chen konnte gezeigt werden, dass die Φ_{Δ} von an HSA-NP gebundenem mTHPP sehr viel geringer ist als die von freiem mTHPP ohne NP (siehe Tabelle 5)

Die geringe Phototoxizität der mTHPP beladenen HSA-NP ist eine Folge dieser Bedingungen.

6.1.2 Vernetzungsgrad der HSA-Monomere in den Nanopartikeln

In den folgenden Experimenten wurden die intrazelluläre Aufnahme, die Dunkeltoxizität und die Phototoxizität von mTHPP-beladenen HSA-NP quantifiziert. Die HSA-Monomere in diesen Partikeln wurden zu 40 % (mTHPP-HSA40), zu 100 % (mTHPP-HSA100) oder mit einem 200 %-Überschuss mit GB vernetzt.

6.1.2.1 Intrazelluläre Aufnahme von mit mTHPP beladenen unterschiedlich mit GB-Brücken quervernetzten HSA-Nanopartikeln

Die durch Aufnahme der NP erreichten intrazellulären mTHPP-Konzentrationen im Vergleich zu denen von mit freiem mTHPP inkubierten (ohne NP) Jurkatzellen sind in Abbildung 6.4 dargestellt.

6.1 Bestimmung des optimalen PS-HSA-Nanopartikelsystems

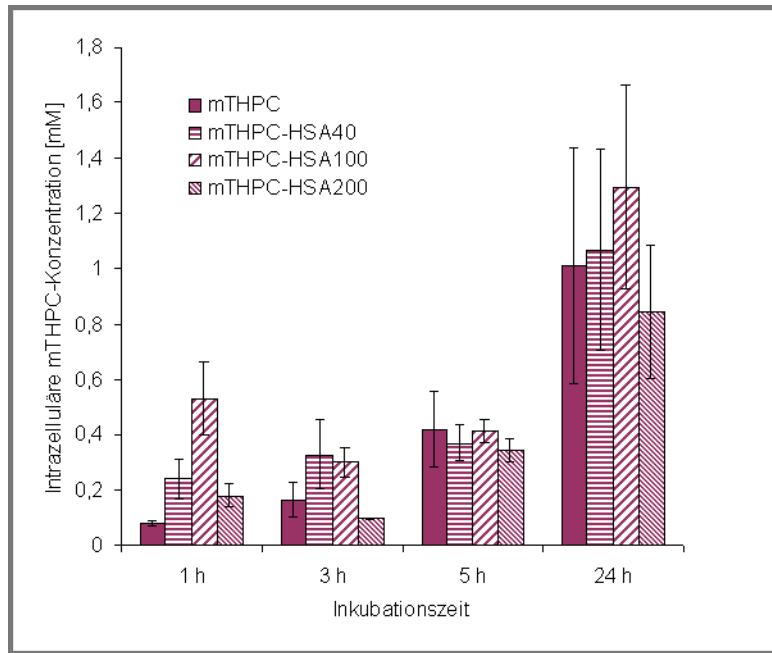


Abbildung 6.4: Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPC, mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die Inkubation aller untersuchten mTHPC-beladenen HSA-NP-Proben führt zu einer mTHPC-Anreicherung in Jurkatzellen. In den ersten 3 h Inkubation ist die intrazelluläre mTHPC-Konzentration der mit mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 inkubierten Zellen höher als die der mit mTHPC (ohne NP) inkubierten. Nach 5 h und 24 h Inkubation sind jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr messbar.

Die intrazelluläre mTHPC-Konzentration der mit mTHPC-HSA40 und mTHPC-HSA200 inkubierten Zellen steigt stetig mit der Inkubationszeit, von etwa 0,2 mM auf etwa 1 mM. Die mTHPC-HSA100-inkubierten Zellen weisen bereits nach 1 h Inkubation eine signifikant höhere intrazelluläre mTHPC-Konzentration auf ($0,5 \text{ mM} \pm 0,1 \text{ mM}$).

Diese mTHPC-beladenen NP sind genau wie die mTHPP-beladenen HSA-NP adsorptiv beladen. Das bedeutet, die PS befinden sich größtenteils auf der Oberfläche der NP. Die Beladung (ca. $20 \mu\text{g}/\text{mg}$) und die Größe der Partikel sind ebenfalls vergleichbar.

Die bessere Aufnahme der mTHPC-beladenen HSA-NP verglichen mit der geringen Aufnahme der mTHPP-beladenen HSA-NP ist ein Hinweis auf unterschiedliche Wechselwirkungen der beiden verschiedenen PS mit zellulären Bestandteilen.

6.1.2.2 Photo- und Dunkeltoxizität von mTHPC beladenen unterschiedlich mit GB-Brücken quervernetzten HSA-Nanopartikeln

Die Ergebnisse der Dunkeltoxizitätsmessung an mit mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 inkubierten Jurkatzellen im Vergleich zu mTHPC (ohne NP) sind in Abbildung 6.5 dargestellt.

Die Totzellrate der mit mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 liegt unter 5 % und damit im normalen Bereich. mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 zeigen keine toxische Wirkung auf unbestrahlte Jurkatzellen.

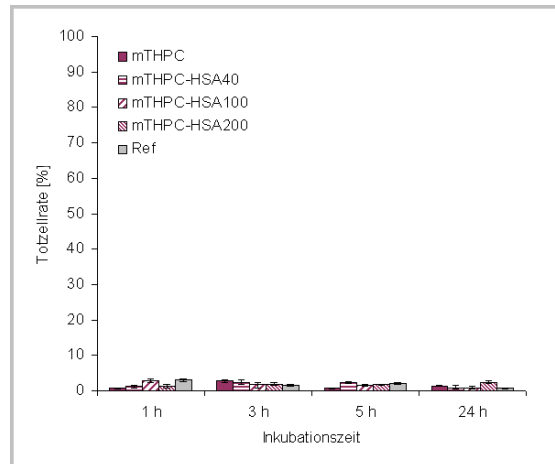


Abbildung 6.5: Dunkeltoxizität von mTHPC, mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100, mTHPC-HSA200, und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die Ergebnisse der Phototoxizitätsmessung an mit mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 inkubierten Jurkatzellen im Vergleich zu mTHPC (ohne NP) sind in Abbildung 6.6 dargestellt.

Die Apoptoserate der 1 h mit mTHPC-HSA40 ($23 \% \pm 1 \%$), mTHPC-HSA100 ($15 \% \pm 1 \%$) und mTHPC-HSA200 ($8 \% \pm 1 \%$) inkubierten Jurkatzellen sind deutlich geringer als die sehr hohe Apoptoserate von 1 h mit mTHPC ($77 \% \pm 8 \%$) inkubierten Jurkatzellen. Auch nach 3 h Inkubation sind die Apoptoseraten von mit mTHPC-HSA40 ($59 \% \pm 3 \%$), mTHPC-HSA100 ($52 \% \pm 4 \%$) und mTHPC-HSA200 ($38 \% \pm 1 \%$) inkubierten Jurkatzellen noch geringer als die sehr hohe Apoptoserate von 1 h mit mTHPC ($80 \% \pm 10 \%$) inkubierten Jurkatzellen.

Besonders interessant sind nach 1 h und 3 h Inkubation jedoch die Unterschiede zwischen den drei verschieden stark mit GB quervernetzten HSA-NP. Die Phototoxizität der nur schwach quervernetzten mTHPC-HSA40-NP steigt signifikant schneller als die der stärker quervernetzten mTHPC-HSA100-NP. Am geringsten ist nach 1 h und 3 h Inkubation die Phototoxizität der am stärksten quervernetzten mTHPC-HSA200-NP.

6.1 Bestimmung des optimalen PS-HSA-Nanopartikelsystems

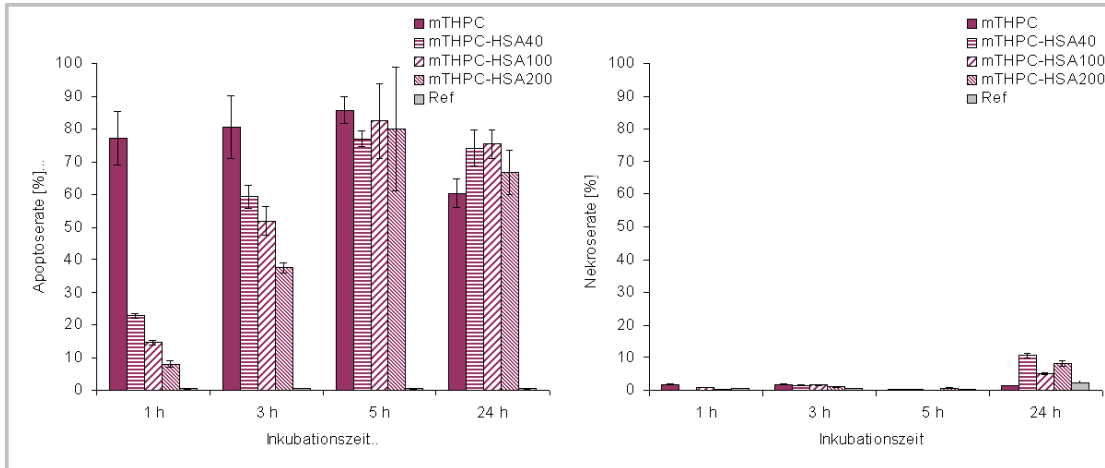


Abbildung 6.6: Phototoxizität von mTHPC, mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100, mTHPC-HSA200, und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Dieser Effekt liegt nicht an unterschiedlichen intrazellulären mTHPC-Konzentrationen, denn diese unterscheiden sich nach Inkubation mit mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 nicht.

Die verschieden starke Quervernetzung der HSA-Monomere in den NP beeinflusst die Geschwindigkeit des lysosomalen Abbaus der NP und damit die zum jeweiligen Zeitpunkt der Inkubation Menge an ins Zytoplasma freigesetztem mTHPC.

Nach 5 h Inkubation wird mit allen drei NP eine sehr hohe Apoptoserate erreicht (mTHPC-HSA40 (77 % \pm 2 %), mTHPC-HSA100 (82 % \pm 12 %) und mTHPC-HSA200 (80 % \pm 19 %)), hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben mehr erkennbar. Nach 5 h Inkubation mit mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 ist in allen Proben ausreichend viel mTHPC intrazellulär freigesetzt um maximale Phototoxizität zu erreichen.

In 1 h, 3 h und 5 h mit mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 inkubierten und bestrahlten Jurkatzellen konnte keine signifikant erhöhte Nekroserate beobachtet werden.

Im Gegensatz zur Phototoxizität von freiem mTHPC (ohne NP) sinkt die Phototoxizität der verschiedenen mTHPC-beladenen HSA-NP nach 24 h Inkubation nicht. Ein weiterer Unterschied ist die mit 5 % bis 10 % signifikant erhöhte Nekroserate der mit mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 24 h inkubierten Jurkatzellen.

In den photophysikalischen Untersuchungen von Kuan Chen konnte gezeigt werden, dass die Φ_{Δ} von an HSA-NP gebundenem mTHPC sehr viel geringer ist als die von freiem mTHPC ohne NP (siehe Tabelle 6). Die mit der Inkubationszeit steigende Phototoxizität in den mit mTHPC-HSA inkubierten Jurkatzellen weist daher auf die vermehrte intrazelluläre Freisetzung des mTHPC in den Zellen hin.

6.1.3 PS-Beladungsrate der HSA-Nanopartikel

In den folgenden Experimenten wurden die intrazelluläre Aufnahme, die Dunkeltoxizität und die Phototoxizität von mit unterschiedlicher Menge mit mTHPC-beladenen HSA-NP quantifiziert. Die hier untersuchten HSA-NP sind zu 100% mit GB vernetzt. Die Beladungsrate beträgt 18 µg/mg bzw. 31 µg/mg (mTHPC/HSA)

6.1.3.1 Photo- und Dunkeltoxizität von mit mTHPC beladenen HSA-Nanopartikeln mit unterschiedlicher Beladungsrate

Die Ergebnisse der Dunkeltoxizitätsmessung an mit 18mTHPC-HSA100 und 31mTHPC-HSA100 inkubierten Jurkatzellen im Vergleich zu mTHPC (ohne NP) sind in Abbildung 6.7 dargestellt.

Die Totzellrate der mit 18mTHPC-HSA100 und 31mTHPC-HSA100 liegt unter 5 % und damit im normalen Bereich. 18mTHPC-HSA100 und 31mTHPC-HSA100 zeigen keine toxische Wirkung auf unbestrahlte Jurkatzellen.

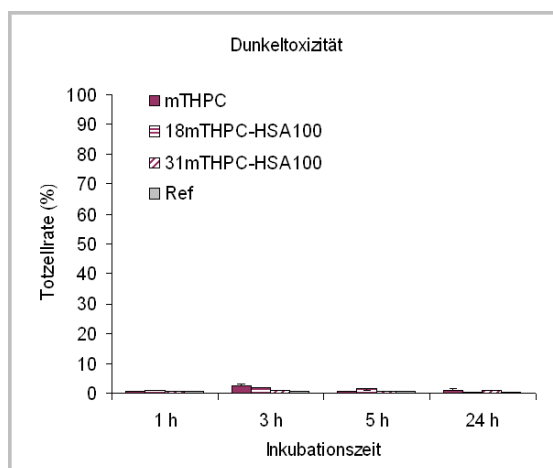


Abbildung 6.7: Dunkeltoxizität von mTHPC, 18mTHPC-HSA100, 31mTHPC-HSA100 und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die Ergebnisse der Phototoxizitätsmessung an mit 18mTHPC-HSA100 und 31mTHPC-HSA100 inkubierten Jurkatzellen im Vergleich zu mTHPC (ohne NP) sind in Abbildung 6.8 dargestellt.

Die Apoptoserate der 1 h mit 18mTHPC-HSA100 ($26 \% \pm 1 \%$) und 31mTHPC-HSA100 ($13 \% \pm 1 \%$) inkubierten Jurkatzellen ist deutlich geringer als die sehr hohe Apoptoserate von 1 h mit mTHPC ($77 \% \pm 8 \%$) inkubierten Jurkatzellen.

Nach 3 h und 5 h Inkubation mit 18mTHPC-HSA100 und 31mTHPC-HSA100 liegt die Apoptoserate etwa in der selben Größenordnung wie die der mit mTHPC-inkubierten Jurkatzellen.

Die Apoptoserate der deutlich geringer mit mTHPC-beladenen 18mTHPC-HSA100-NP liegt nach 3 h etwas höher ($89 \% \pm 6 \%$) als die der stärker beladenen 31mTHPC-

6.1 Bestimmung des optimalen PS-HSA-Nanopartikelsystems

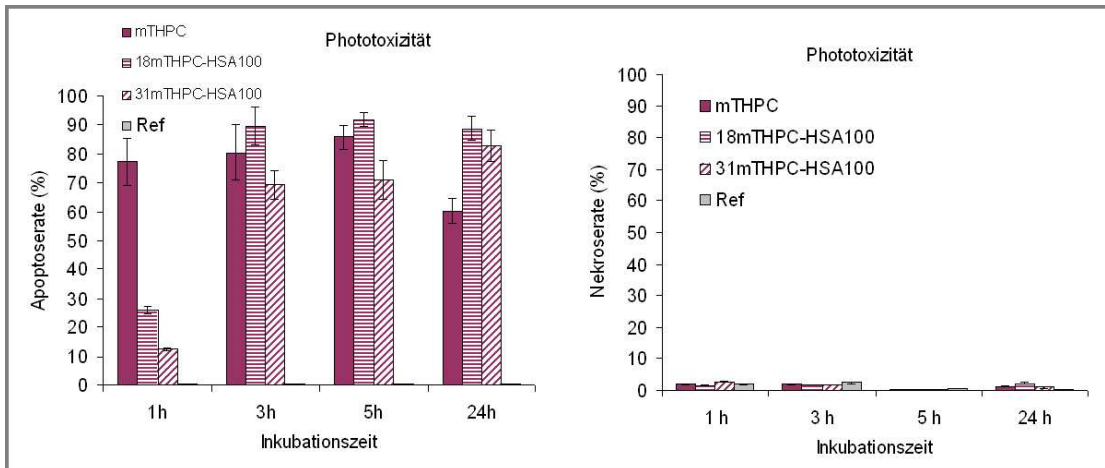


Abbildung 6.8: Phototoxizität von mTHPC, 18mTHPC-HSA100, 31mTHPC-HSA100 und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

HSA100-NP ($69 \% \pm 5 \%$). mTHPC (ohne NP)-inkubierte Jurkatzellen liegen hier bei einer Apoptoserate von $80 \% \pm 10 \%$. Die Apoptoseraten aller Proben nach 5 h Inkubation unterscheiden sich nicht signifikant von denen nach 3 h Inkubation.

Nach 24 h Inkubation sinkt die Apoptoserate von mit mTHPC inkubierten Jurkatzellen, die von mit 18mTHPC-HSA100 inkubierten Zellen bleibt jedoch sehr hoch ($89 \% \pm 4 \%$) während die von mit 31mTHPC-HSA100 inkubierten Zellen noch steigt ($83 \% \pm 4 \%$). Nach 24 h ist damit kein signifikanter Unterschied zwischen 18mTHPC-HSA100 und 31mTHPC-HSA100 mehr messbar.

Das Maximum an intrazellulärer mTHPC-Konzentration wird sowohl für mTHPC (ohne NP) als auch für mTHPC-beladene HSA-NP erst nach 24 h Inkubation erreicht. Trotzdem ist die Phototoxizität bereits nach 3 h Inkubation sehr hoch. Dieses Ergebnis illustriert besonders deutlich, dass die Menge an aufgenommenem PS für eine effektive Photosensibilisierung sehr viel weniger wichtig ist als die lysosomale Freisetzung und damit verbundene intrazelluläre Verteilung.

6.1.4 Endozytische Aufnahme der mit mTHPP und mTHPC beladenen HSA Nanopartikel und intrazelluläre Freisetzung der Photosensibilisatoren

Für die folgenden Untersuchungen wurden HSA-NP verwendet die zu 100% mit GB vernetzt sind und eine Beladungsrate von $18 \mu\text{g}/\text{mg}$ (HSA/PS) haben. Die HSA-NP wurden während der Synthese mit $0,75 \text{ mM}$ HSA-Monomeren in der Suspension stabilisiert.

Es werden sowohl mit mTHPP als auch mit mTHPC beladene HSA-NP untersucht.

6.1.4.1 Endozytotische Aufnahme von mit mTHPP-beladenen HSA-Nanopartikeln, Nachweis mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie

Im Folgenden wurde die endozytotische Aufnahme der mTHPP-beladenen HSA-NP untersucht. Die CLSM-Bilder der mit freiem mTHPP beziehungsweise mTHPP-HSA inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 6.9 dargestellt.

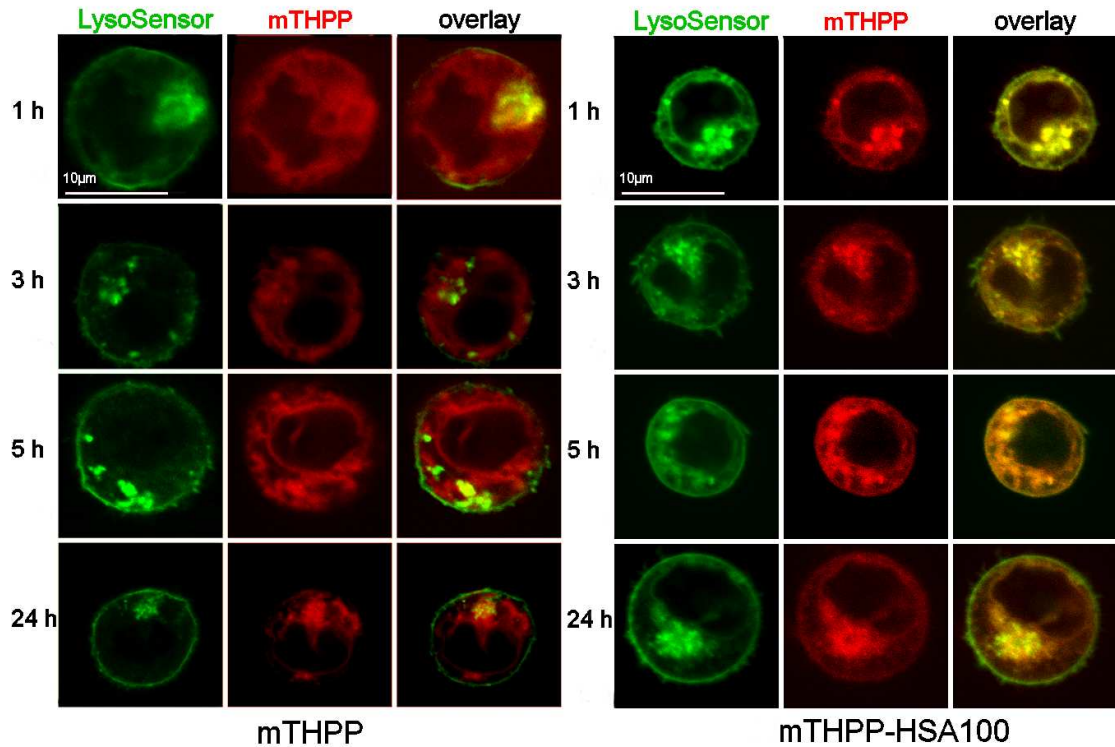


Abbildung 6.9: CLSM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPP und mTHPP-HSA. Die Endosomen und Lysosomen der Zellen wurden mit LysoSensor green markiert (grüne Fluoreszenz), die rote Fluoreszenz stammt vom mTHPP. Gelbe Signale im Overlay charakterisieren die Kolokalisation von mTHPP und LysoSensor green. Anregungswellenlänge für beide Farbstoffe: $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$. Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$).

Die Messung zeigt, dass das mTHPP in allen Proben innerhalb der Zellen, im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert ist. Im Bereich des Zellkerns oder ausserhalb der Zelle mit der Zytoplasmamembran assoziiert, ist kein mTHPP zu finden.

In den mit mTHPP inkubierten Zellen unterscheiden sich die Verteilungsmuster der Endosomen und Lysosomen (grün) zu allen Inkubationszeiten stark von denen der mTHPP-Moleküle (rot). Hier liegt also keine endozytotische Aufnahme vor. Die mTHPP-Moleküle sind in der Lage die Zytoplasmamembran und intrazelluläre Membranen -die

Kernmembranen ausgenommen- zu penetrieren.

Im Kontrast dazu zeigen die mit mTHPP-HSA inkubierten Jurkatzellen eine starke Kolokalisation von LysoSensor green (grün) und mTHPP (rot). Erst in den 24 h mit mTHPP-HSA inkubierten Jurkatzellen sind neben den gelben Kolokalisationssignalen auch nicht kolokalisierte mTHPP- und LysoSensor green-Signale zu erkennen.

Die mTHPP-HSA-NP werden endozytotisch aufgenommen. Eine intralysosomale Freisetzung der mTHPP-Moleküle von den NP scheint, verglichen mit den PHSA100-NP, erst sehr spät (≥ 24 h) zu beginnen. Genau wie die endozytotische Aufnahme der NP ist auch die Freisetzung der PS nur durch aktive enzymatische Prozesse möglich.

Auch die Aufnahmegeschwindigkeit der mTHPP-HSA-NP ist deutlich verlangsamt (siehe Abschnitt 6.1.1.1 Abbildung 6.1). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis auf einen Einfluss von mTHPP-Wechselwirkungen mit zellulären Bestandteilen auf aktive zelluläre Prozesse.

6.1.4.2 Endozytotische Aufnahme von mit mTHPC beladenen HSA-Nanopartikeln, Nachweis mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie

Im Folgenden wurde die endozytotische Aufnahme der mTHPC-beladenen HSA-NP im Vergleich zur Aufnahme von freiem mTHPC untersucht.

Die Streulicht- und CLSM-Bilder von mit freiem mTHPC-inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 6.10 dargestellt.

Die Messung zeigt, dass das mTHPC in allen Proben innerhalb der Zellen im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert ist. Im Bereich des Zellkerns, oder ausserhalb mit der Zytoplasmamembran assoziiert, ist kein mTHPC zu finden.

Im Gegensatz zu den PS Pheo und mTHPP ist in den mTHPC-inkubierten Jurkatzellen nach 1 h und 3 h Inkubation eine Kolokalisation von LysoSensor green und mTHPC detektierbar. Nach 5 h und 24 h Inkubation ist keine Kolokalisation mehr sichtbar. Die mTHPC-Moleküle werden demnach auch über Endozytose aufgenommen.

mTHPC hat eine hohe Affinität zu Proteinen, vor allem zu Albuminen. Die hohe Konzentration von bovines Serumalbumin (BSA) im Nährmedium bewirkt eine Anlagerung der mTHPC-Moleküle ans BSA. Als mTHPC-BSA-Komplex kann es die Zytoplasmamembran nicht mehr penetrieren, daher wird es ebenfalls endozytotisch aufgenommen. Die Freisetzung innerhalb der Lysosomen dauert zwischen 3 h und 5 h.

Die Streulicht- und CLSM-Bilder von mit mTHPC-HSA100 inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 6.11 dargestellt.

Die Messung zeigt, dass das mTHPC in allen Proben innerhalb der Zellen, im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert ist. Im Bereich des Zellkerns, oder ausserhalb mit der Zytoplasmamembran assoziiert, ist kein mTHPC zu finden.

Nach 1 h und 3 h ist eine deutliche Kolokalisation von LysoSensor green und mTHPC detektierbar. Die NP werden also endozytotisch aufgenommen. Die Freisetzung aus den Lysosomen beginnt nach 3 h Inkubation, nach 5 h und 24 h Inkubation unterscheiden sich die intrazellulären Verteilungsmuster von mTHPC und LysoSensor green stark, es ist keine Kolokalisation mehr detektierbar.

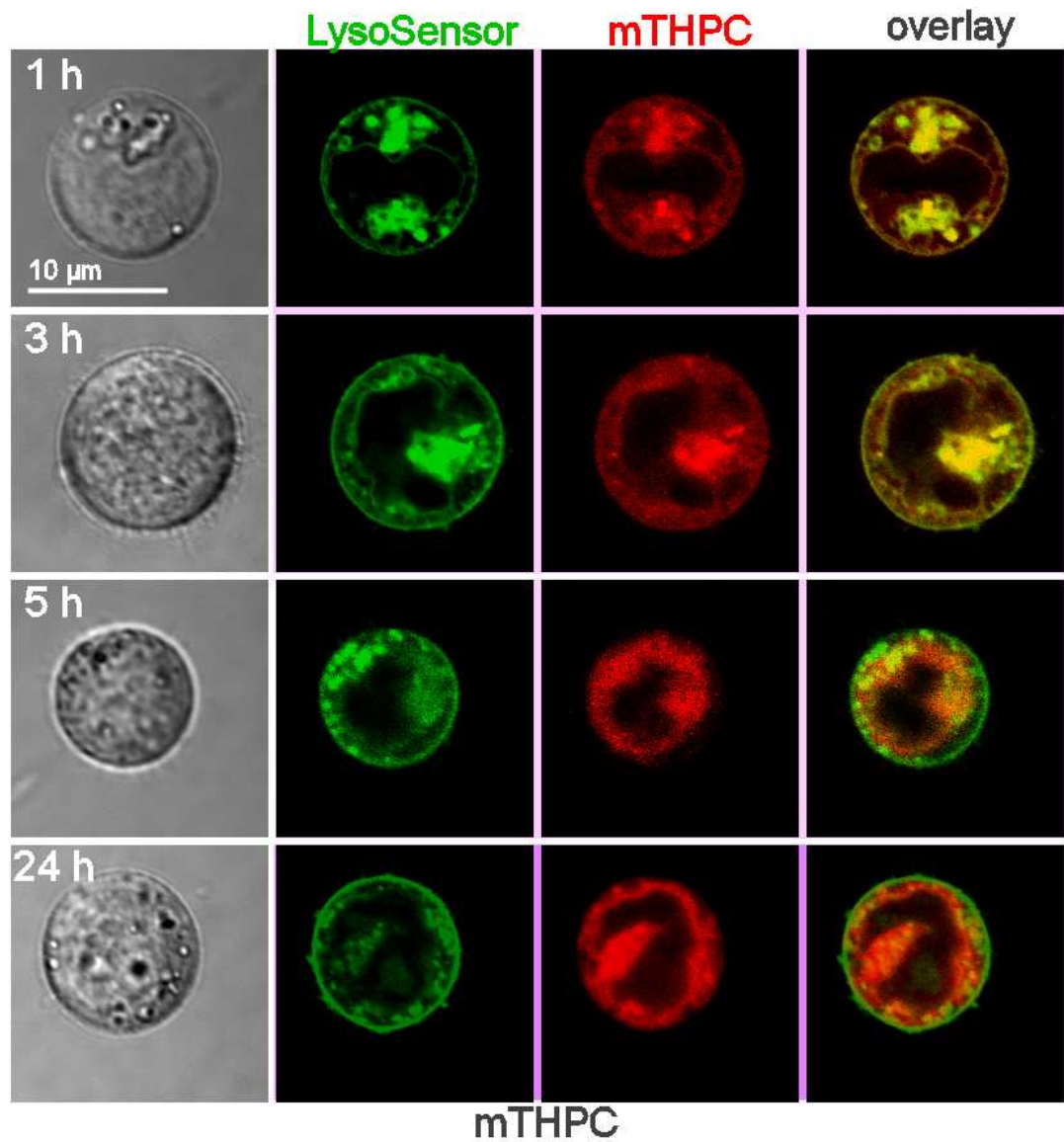


Abbildung 6.10: CLSM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPC. Die Endosomen und Lysosomen der Zellen wurden mit LysoSensor green markiert (grün), die rote Fluoreszenz stammt vom mTHPC. Gelbe Signale im Overlay charakterisieren die Kolokalisation von mTHPC und LysoSensor green. Anregungswellenlänge für beide Farbstoffe: $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$. Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$).

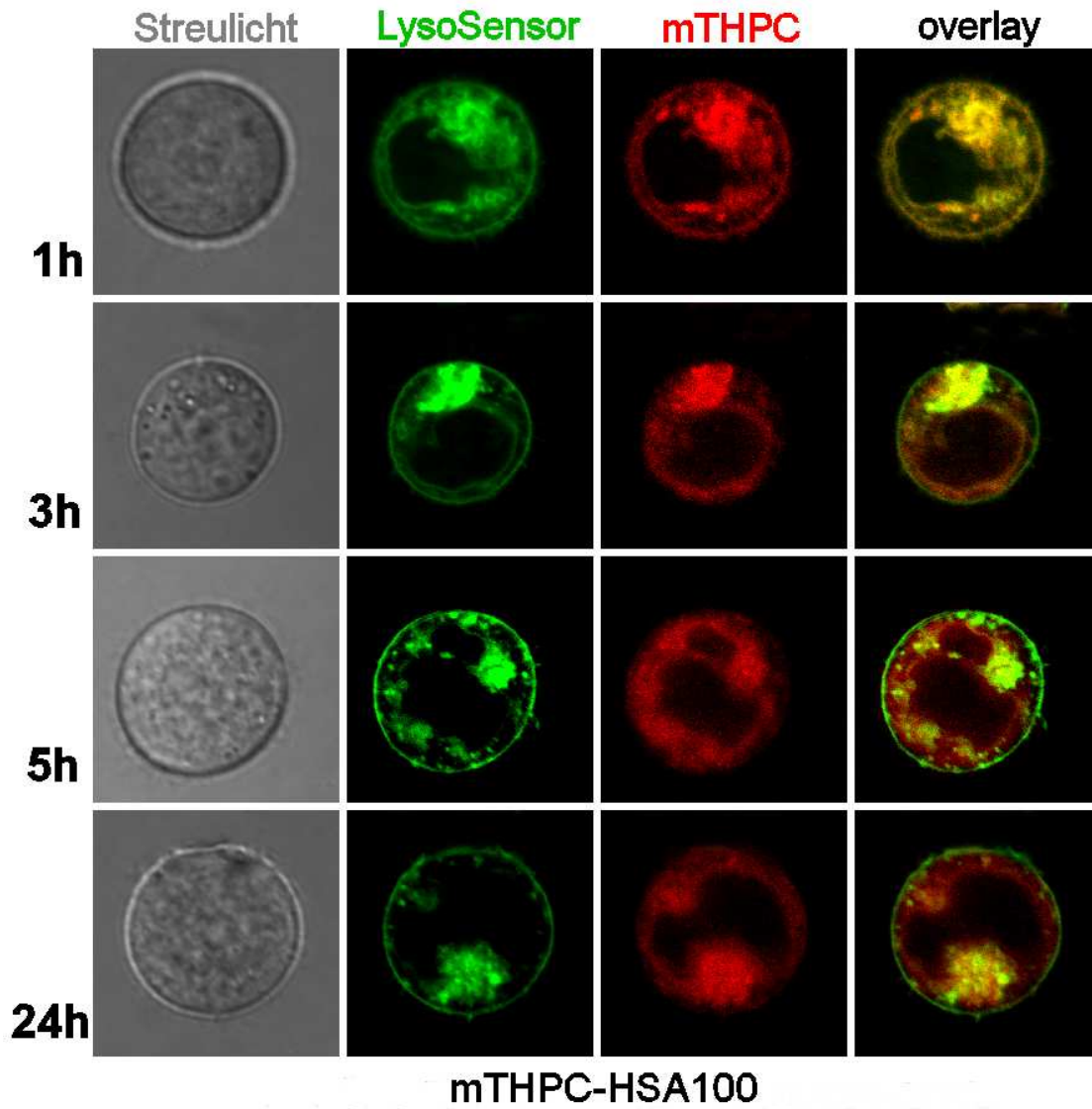


Abbildung 6.11: CLSM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPC-HSA100. Die Endosomen und Lysosomen der Zellen wurden mit LysoSensor green markiert (grüne Fluoreszenz), die rote Fluoreszenz stammt vom mTHPC. Gelbe Signale im Overlay charakterisieren die Kolokalisation von mTHPC und LysoSensor green. Anregungswellenlänge für beide Farbstoffe: $\lambda_{ex} = 405$ nm. Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$).

Der Unterschied der strukturierten Verteilung der Lysosomen und Endosomen im Vergleich zu der sehr homogenen Verteilung von mTHPPC ist nach 5 h und 24 h sehr deutlich. Aber auch nach 3 h Inkubation ist bereits ein Teil der mTHPPC-Fluoreszenz ausserhalb der Lysosomen sichtbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Freisetzungsprozess bereits nach 3 h Inkubation beginnt.

6.1.4.3 Lysosomaler Abbau der mTHPP-HSA Nanopartikel, Nachweis mittels Fluoreszenz Lifetime Imaging

Die FLIM-Bilder und die dazugehörigen Histogramme über die Häufigkeit der in den Bildern gemessenen Fluoreszenzlebensdauern, der mit mTHPP und mTHPP-HSA100 inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 6.12 dargestellt.

Die Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern in den 1 h, 3 h und 5 h mit mTHPP inkubierten Jurkatzellen liegt im Mittel relativ konstant bei 8,9 ns bis 9,0 ns. Nach 24 h Inkubation verkürzt sich diese mittlere Fluoreszenzlebensdauer auf etwa 8,5 ns. Neben der Verkürzung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer verbreitert sich auch die Verteilungskurve (siehe Histogramm, Abbildung 6.12, unten) zu den kürzeren Fluoreszenzlebensdauern hin etwas.

Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Mikroumgebung der mTHPP-Moleküle innerhalb der Zelle ändert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die intrazelluläre Lokalisation der mTHPP-Moleküle verändert. Dieser Hinweis findet sich auch in den CLSM-Bildern wieder (siehe Abbildung 6.9, Abschnitt 6.1.4.1). Während die intrazelluläre Verteilung der mTHPP-Fluoreszenz am Anfang der Inkubationszeit noch sehr homogen ist, ist das mTHPP-Fluoreszenzmuster nach 24 h Inkubation deutlich strukturierter. Eine genauere Aussage über die intrazelluläre Lokalisation ist mit diesem Experiment jedoch nicht möglich.

Im Vergleich zu den mit mTHPP inkubierten Zellen, zeigen die mTHPP-HSA100-inkubierten Zellen über die Inkubationszeit keine signifikante Änderung der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzlebensdauern. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer liegt zu allen Inkubationszeiten etwa bei 8,6 ns, lediglich die Breite der Verteilungskurve nimmt nach 24 h etwas zu. Innerhalb der 24 h Inkubation ändert sich die Mikroumgebung der mTHPP-Moleküle also kaum, das heißt, dass trotz der endozytotischen Aufnahme kaum ein lysosomaler Abbau der mTHPP-HSA100-NP stattfindet, der die Freisetzung der mTHPP-Moleküle ermöglichen könnte.

Dies bestätigt die CLSM-Messung (siehe Abbildung 6.9, Abschnitt 6.1.4.1). Hier ist zu allen Inkubationszeiten eine Lokalisation der mTHPP-Moleküle in Endosomen und Lysosomen zu sehen. Erst nach 24 h ist neben der lysosomalen Lokalisation auch in anderen Bereichen des Zytoplasmas in geringem Maße mTHPP-Fluoreszenz detektierbar.

Dies steht in Widerspruch zu den Beobachtungen an Pheo-beladenen HSA-NP, welche innerhalb der 24 h Inkubation das Pheo vollständig freisetzen. Neben der endozytotischen Aufnahme der NP ist auch deren Abbau in den Lysosomen ein enzymatischer Prozess.

Auch die Aufnahme dieser adsorptiv mit mTHPP-beladenen HSA-NP ist verlangsamt (siehe Abbildung 6.1, Abschnitt 6.1.1.1). Daher ist auch dieses Ergebnis ein Hinweis auf die inhibitorische Wirkung von mTHPP auf enzymatische Prozesse in Jurkatzellen.

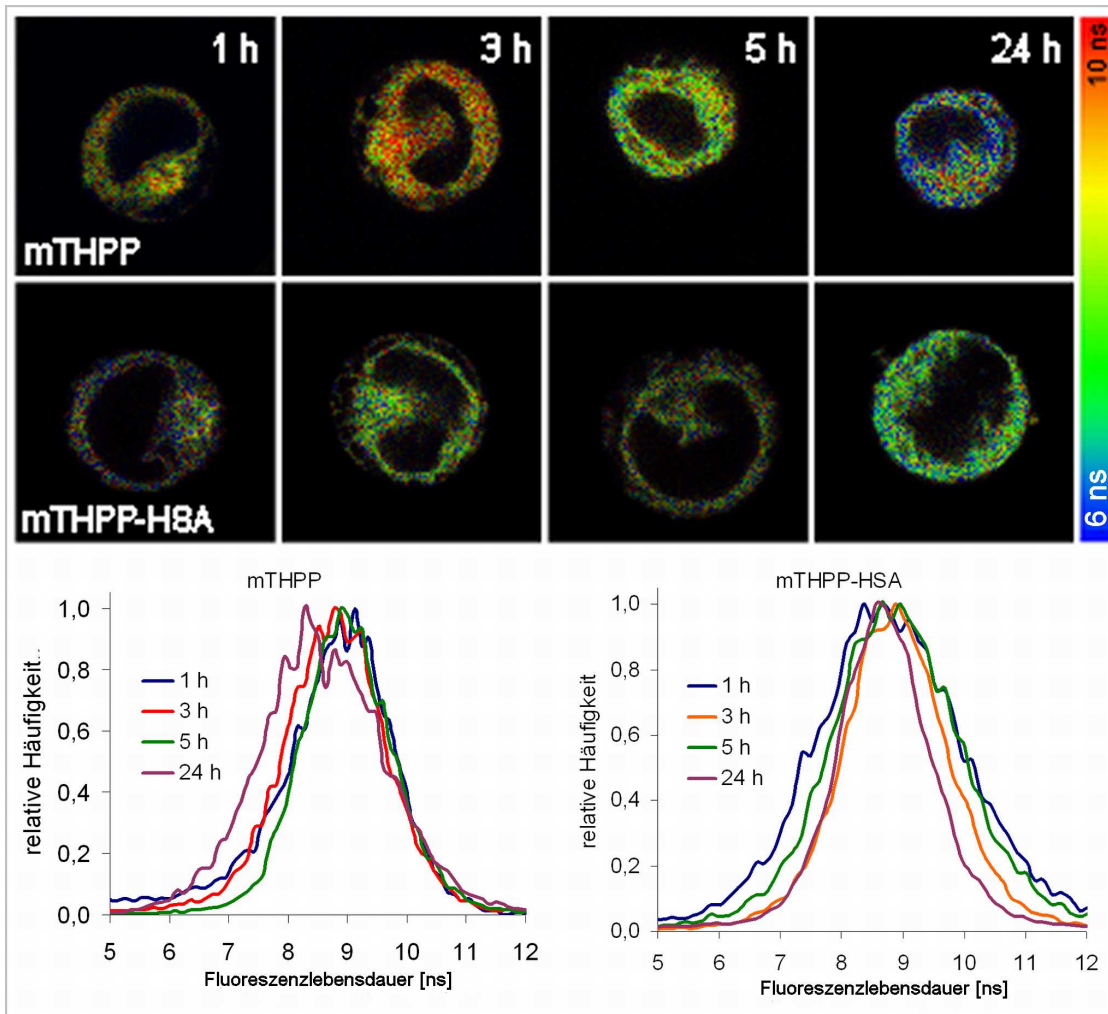


Abbildung 6.12: FLIM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPP und mTHPP-HSA100. Fluoreszenzanregung mit einem gepulsten ns-Laser ($\lambda_{ex} = 440$ nm). Die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern jedes Pixels sind farbcodiert dargestellt (siehe Farbskala). Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$). Die Histogramme (unten) zeigen die relative Häufigkeit der in je 4 verschiedenen Zellen gemessenen Fluoreszenzlebensdauern.

6.1.4.4 Lysosomaler Abbau der mTHPC-HSA Nanopartikel, Nachweis mittels Fluoreszenz Lifetime Imaging

Die FLIM-Bilder und die dazugehörigen Histogramme über die Häufigkeit der gemessenen Fluoreszenzlebensdauern, der mit mTHPC und mTHPC-HSA100 inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 6.13 dargestellt.

Die Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern in den 1 h, 3 h und 5 h mit mTHPC inkubierten Jurkatzellen liegt im Mittel relativ konstant bei 8,9 ns bis 9,0 ns. Nach 24 h Inkubation verkürzt sich diese mittlere Fluoreszenzlebensdauer stark, auf etwa 7,4 ns (siehe Histogramm, Abbildung 6.13, links).

Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Mikroumgebung der mTHPC-Moleküle innerhalb der Zelle stark ändert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die intrazelluläre Lokalisation der mTHPC-Moleküle verändert. Dieser Hinweis findet sich auch in den CLSM-Bildern wieder (siehe Abbildung 6.9, Abschnitt 6.1.4.1). Die Bilder zeigen deutlich, dass auch freies mTHPC über Endozytose aufgenommen wird. Es ist anzunehmen, dass mTHPC assoziiert an im Nährmedium befindliche Albumine endozytotisch in die Zelle gelangt. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass auch hier ein lysosomaler Freisetzungsprozess stattfindet.

Die Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern in den 1 h und 3 h mit mTHPC-HSA inkubierten Jurkatzellen ist der von mTHPC (ohne NP) inkubierten Zellen sehr ähnlich und liegt im Mittel relativ konstant bei 8,9 ns bis 9,0 ns. Hier findet jedoch schon eine leichte Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauer nach 5 h Inkubation auf eine mittlere Fluoreszenzlebensdauer von etwa 8,3 ns statt. Nach 24 h Inkubation verkürzt sich diese mittlere Fluoreszenzlebensdauer wieder, auf etwa 8,5 ns (siehe Histogramm, Abbildung 6.13, unten).

Die sehr ähnliche Fluoreszenzlebensdauer-Verteilung nach 1 h und 3 h Inkubation mit mTHPC und mTHPC-HSA spricht für die These, dass mTHPC nicht frei, sondern assoziiert mit Albuminen vorliegt.

Auch die ähnliche Dynamik der Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer mit der Inkubationszeit spricht dafür, dass hier ähnliche Prozesse stattfinden.

Da sich freies mTHPC in Jurkatzellen sehr ähnlich verhält wie mittels mTHPC-HSA transportiertes, kann mit den CLSM- und FLIM-Versuchen nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass die mTHPC-HSA-NP wirklich stabil sind, und das mTHPC wirklich mit NP in die Zellen transportiert wird.

6.1 Bestimmung des optimalen PS-HSA-Nanopartikelsystems

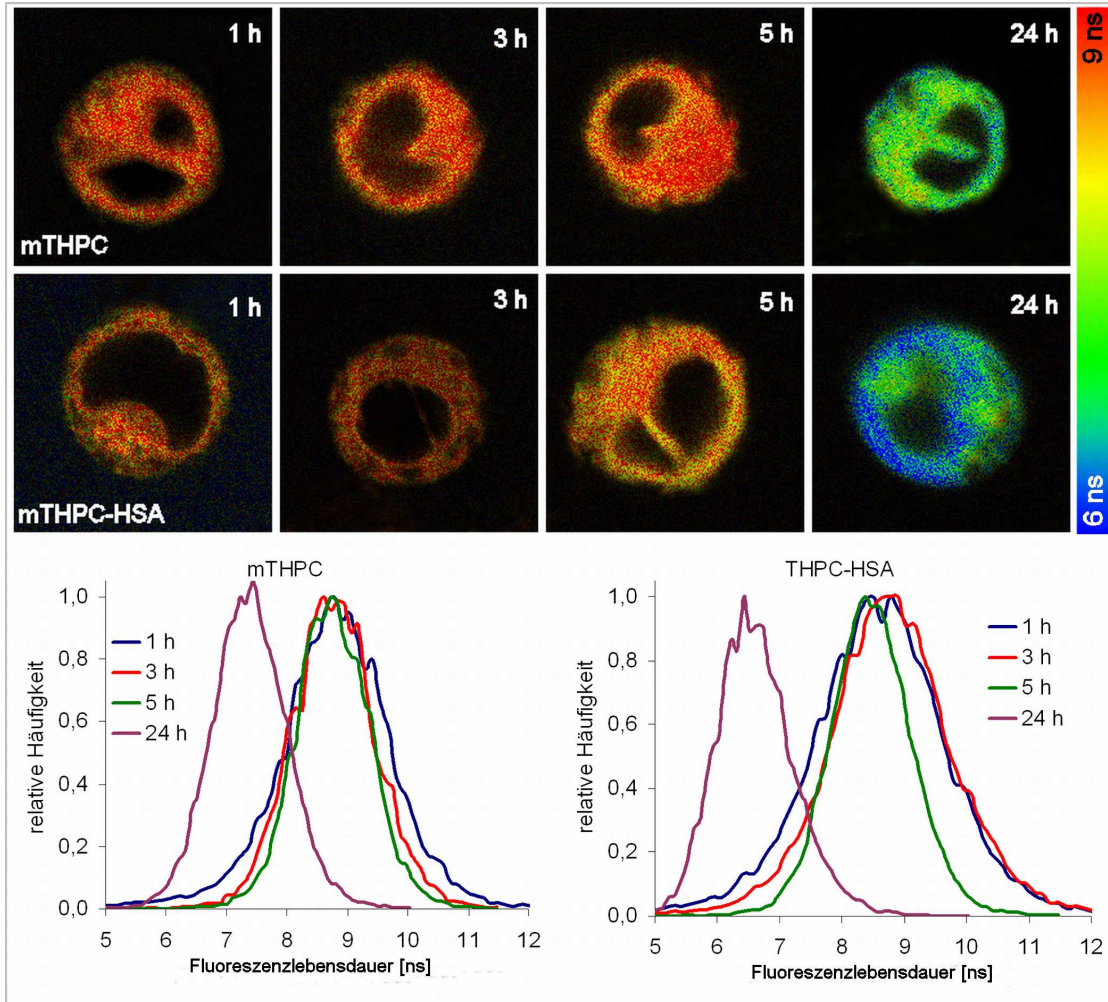


Abbildung 6.13: FLIM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPC und mTHPC-HSA. Fluoreszenzanregung mit einem gepulsten ns-Laser ($\lambda_{ex} = 440 \text{ nm}$). Die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern jedes Bildpunktes sind farbco-diert dargestellt (siehe Farbskala). Die Histogramme (unten) zeigen die relative Häufigkeit der in je vier verschiedenen Zellen gemessenen Fluoreszenzlebensdauern.

6.2 Diskussion - photodynamische Wirksamkeit photoaktiver HSA-Nanopartikel

In den vorangegangenen Abschnitten dieses Kapitels wurden die Ergebnisse aller Untersuchungen an PS-beladenen HSA-NP beschrieben. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten PS-HSA-NP-Systeme PS in Jurkatzellen transportieren, diese dort anreichern und mittels Bestrahlung Zelltodmechanismen auslösen werden können.

Die hier dargestellten Ergebnisse belegen damit das Potential von HSA-NP als Transportsystem für Wirkstoffe der PDT. Die Effizienz der photodynamischen Wirkung der verschiedenen untersuchten PS-HSA-NP-Systeme unterscheidet sich jedoch stark.

Verschiedene Eigenschaften der PS-HSA-NP-Systeme beeinflussen die Effizienz der Photosensibilisierung und die Eignung der Systeme als Wirkstoff-Transporter. Eine der wichtigsten Eigenschaften, welche Voraussetzung ist für die Verwendung als Transportsysteme, ist die Stabilität der adsorptiven PS-HSA Verbindung unter biologisch relevanten Bedingungen. Die Effizienz der Photosensibilisierung kann durch Eigenschaften der HSA-NP selbst beeinflusst werden. Eine große Rolle spielen aber auch die Wahl der PS und die Beladungsrate.

Die verschiedenen Eigenschaften der PS-beladenen HSA-NP beeinflussen die für eine effektive Photosensibilisierung relevanten zellulären Prozesse. Daher soll in den folgenden Abschnitten nicht nur auf die Eigenschaften der PS-beladenen HSA-NP selbst, sondern auch auf die zellulären Prozesse eingegangen werden, welche die Effizienz der Photosensibilisierung beeinflussen.

Neben der Geschwindigkeit der endozytotischen Aufnahme und damit der intrazellulären PS-Konzentration zum Zeitpunkt der photodynamischen Behandlung, spielen vor allem lysosomale Abbauprozesse der NP und die damit verbundene Freisetzung der PS eine große Rolle. Die Mikroumgebung der PS-Moleküle zum Zeitpunkt der Bestrahlung beeinflusst die Fähigkeit zur $^1\text{O}_2$ -Generierung und damit die erreichbare Photosensibilisierung. Die Eigenschaften der PS und die Effizienz der intrazellulären Freisetzung entscheiden über die intrazelluläre Verteilung und Lokalisation der PS.

Dieser Arbeit vorangegangene photophysikalische Untersuchungen an den verschiedenen mit PS beladenen HSA-NP zeigen, dass die PS Moleküle auf den NP stark mit einander wechselwirken, was die Fähigkeit zur $^1\text{O}_2$ -Generierung deutlich reduziert (siehe Abschnitt 1, Tabelle 5, Tabelle 6). Deshalb können erst die durch intrazelluläre Freisetzung monomerisierten PS effizient $^1\text{O}_2$ generieren. Dies spiegelt sich deutlich in den anfangs geringen, und mit fortschreitender Inkubationszeit ansteigenden Phototoxizität der verschiedenen mit PS beladenen HSA-NP wider.

Die intrazelluläre Lokalisation der PS entscheidet nicht nur über die Quantität der Photosensibilisierung, sondern auch über Qualität. Je nachdem, welche Organellen durch $^1\text{O}_2$ beschädigt werden, entscheidet sich, welche intrazellulären Signalwege ausgelöst werden. Mögliche Reaktionen der Zelle sind: Reparatur, Apoptose oder Nekrose.

6.2.1 Einfluss der Photosensibilisatoren auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver HSA-Nanopartikel

Die drei in dieser Arbeit untersuchten PS unterscheiden sich bereits ohne die Verwendung von Transportsystemen stark in ihrer Wirkungseffizienz. Ein kurzer Überblick über die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen an den PS (ohne NP) ist in Tabelle 4.2 gegeben.

Phäophorbid a

Die mit freiem Pheo (ohne NP) erreichbare Phototoxizität in Jurkatzellen ist mit einer Apoptoserate von maximal 48 % nur geringfügig höher als die von mTHPP. Die Dynamik der Veränderung der Phototoxizität von Pheo in Jurkatzellen im Verlauf der Inkubationszeit ist jedoch deutlich anders als die von mTHPP und mTHPC. Die Apoptoserate von mit Pheo inkubierten Jurkatzellen steigt mit der Inkubationszeit kontinuierlich, die höchsten gemessenen Apoptoseraten werden nach 24 h Inkubation erreicht.

Deutlich besser als mit freiem Pheo ist die Effizienz der Photosensibilisierung von mit Pheo-beladenen HSA-NP in Jurkatzellen. Nach 1 h Inkubation ist mit den Pheo-HSA-NP die Phototoxizität noch deutlich geringer als mit freiem Pheo. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich bereits endozytierte mit Pheo beladene HSA-NP noch in den Endosomen und Lysosomen. Der Prozess des Abbaus der NP beginnt erst, noch ist nicht genug Pheo von den NP freigesetzt.

Bereits nach 3 h Inkubation ist die Phototoxizität der mit Pheo-beladenen HSA-NP jedoch deutlich höher als die von freiem Pheo. Nach 24 h kann mit Pheo-beladenen HSA-NP in Jurkatzellen eine Apoptoserate von 85 %, also fast doppelt so viel wie mit freiem Pheo erreicht werden.

Dieser Unterschied wird nicht durch höhere intrazelluläre Pheo-Konzentrationen erreicht. Die endozytotische Aufnahme der NP und deren anschließender lysosomaler Abbau ermöglichen eine für effiziente photodynamische Wirksamkeit bessere Verteilung der Pheo-Moleküle im Zytoplasma als die Aufnahme der freien Pheo-Moleküle (ohne NP) direkt über die Zytoplasmamembran.

Die für mTHPP beobachteten inhibitorischen Effekte auf aktive zelluläre Prozesse konnte für Pheo nicht beobachtet werden. Freies Pheo permeiert direkt durch die Zytoplasmamembran, im Gegensatz zu mit Pheo beladenen HSA-NP welche eindeutig endozytotisch aufgenommen werden. Da diese Unterschiede in der Aufnahme gut beobachtbar sind, gibt es keinen konkreten Verdacht bezüglich eventueller Instabilität der adsorptiven Pheo-HSA-Bindung.

In Verbindung mit Pheo kann an den HSA-NP besonders gut beobachtet werden wie positiv sich die Verwendung von Transportsystemen auch auf die Effizienz des Wirkstoff auswirken kann. Somit beschränkt sich die Aufgabe der Transportsysteme nicht mehr allein auf das Targeting des Zielgewebes.

mTHPP

Im Vergleich zu mTHPC ist die mit mTHPP erreichbare Phototoxizität sehr viel geringer, die erreichbaren Apoptoseraten sind kaum halb so hoch. Die Dynamik der Veränderung

der Phototoxizität von mTHPP in Jurkatzellen im Verlauf der Inkubationszeit ist jedoch ähnlich wie die von mTHPC. Die Phototoxizität innerhalb von 1 h, 3 h und 5 h Inkubation verändert sich kaum, nach 24 h Inkubation ist sie jedoch signifikant geringer.

Noch geringer als die Phototoxizität von freiem mTHPP ist die Phototoxizität von mit mTHPP beladenen HSA-NP. Damit ist die Effizienz der Photosensibilisierung von Jurkatzellen durch mTHPP beladene HSA-NP für Wirkstofftransportsysteme in der PDT nicht akzeptabel.

Diese schlechte Effizienz liegt zum Teil an den spektralen Eigenschaften des mTHPP, vor allem an der geringen Absorption in den Q-Banden. Ein weiterer Einfluss besteht jedoch in, mit den hier verwendeten Methoden nicht genauer spezifizierbaren, Wechselwirkungen des mTHPP mit zellulären Bestandteilen.

Alle Experimente mit mTHPP beladenen NP an Jurkatzellen weisen darauf hin, dass mTHPP inhibitorisch auf diverse aktive zelluläre Prozesse wirkt. Es konnte beobachtet werden, dass die Endozytosegeschwindigkeit langsamer ist, der lysosomale Abbau der mTHPP-beladenen HSA-NP ist ebenfalls verlangsamt. Auch auf das Zellwachstum hat die Anwesenheit von mTHPP im Nährmedium einen verlangsamen Effekt.

PS sollten außer der phototoxischen Wirkung keinen Einfluss auf biologische Strukturen und Prozesse haben. Wechselwirkungen mit biologischen Strukturen, sowohl außerhalb des Zielgewebes, als auch in den Zielzellen führen zu nicht kontrollierbaren, unerwünschten Nebenwirkungen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an mTHPP-beladenen HSA-NP zeigen, dass mTHPP kein geeigneter PS ist. Auch die Verwendung von HSA-NP führt zu keiner Verbesserung der Effizienz der Photosensibilisierung durch mTHPP.

mTHPC

Von allen untersuchten PS wird mit mTHPC die höchste Phototoxizität erreicht. Bereits mit sehr geringen intrazellulären mTHPC-Konzentrationen können sehr hohe Apoptoseraten erreicht werden. Das Maximum der Phototoxizität mit mTHPC inkubierter Jurkatzellen liegt bei 5 h Inkubation, das Minimum bei 24 h Inkubation.

Eine Besonderheit von mTHPC ist seine extrem starke Affinität zu Proteinen, insbesondere zu Albuminen. Diese Eigenschaft bewirkt, dass die eigentlich membrangängigen mTHPC-Moleküle, als Albumin-mTHPC-Komplex endozytotisch, also unter Energieverbrauch aufgenommen werden.

Die hohe Affinität zu Albuminen ist eine Eigenschaft die bei der Entwicklung von Zielgewebe-spezifischen Transportsystemen besonders berücksichtigt werden muss, denn 80 % der im Blutserum vorkommenden Proteinmasse sind Albumine.

Mittels HSA-NP lässt sich mTHPC sehr effizient in Jurkatzellen anreichern. Der Transport des mTHPC mittels HSA-NP in die Jurkatzellen findet mittels Endozytose statt. Nach 3 h Inkubation beginnt die Freisetzung des mTHPC von den HSA-NP, ausgelöst durch deren lysosomalen Abbau. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich noch der größte Teil des mTHPC an den HSA-NP innerhalb der Lysosomen, die sehr geringe Menge an freigesetztem mTHPC ist jedoch bereits ausreichend um die maximale Phototoxizität auszulösen.

Die Phototoxizität der mTHPC-beladenen HSA-NP ist sehr hoch. Die Entwicklung der Phototoxizität im Verlauf der Inkubationszeit der mTHPC-beladenen HSA-NP unterscheidet sich jedoch von der von freiem mTHPC. Besonders auffällig ist, dass trotz höherer intrazellulärer Konzentration die Phototoxizität von mTHPC-beladenen HSA-NP nach 1 h Inkubation sehr viel geringer ist als die von freiem mTHPC. Die zu diesem Zeitpunkt aufgenommenen mTHPC-Moleküle befinden sich verbunden mit den HSA-NP noch in den Lysosomen und sind damit noch nicht in der Lage ihre volle Wirkung zu entfalten.

Der für freies mTHPC beobachtete Abfall der Phototoxizität nach 24 h Inkubation tritt für mTHPC-beladene HSA-NP jedoch nicht ein. Der über einen Zeitraum von einigen Stunden stattfindende Freisetzungsprozess ermöglicht eine zeitlich dosierte Verteilung im Zytoplasma. Diese Dynamik bewirkt, dass auch nach 24 h Inkubation noch genug mTHPC-Moleküle so im Zytoplasma lokalisiert sind, dass eine maximale Wirkung möglich ist.

Die nach Inkubation mit mTHPC-beladenen HSA-NP zu beobachtenden zellulären Prozesse, wie intrazelluläre Anreicherung, lysosomaler NP-Abbau, mTHPC-Freisetzung und -Verteilung, sowie die sehr hohe Phototoxizität zeigen, dass mTHPC-beladene HSA-NP potentiell sehr effiziente Wirkstofftransportsysteme für die PDT sein können.

Das wichtigste Bewertungskriterium, neben den zellulären Prozessen, ist die Frage nach der Stabilität der mTHPC-beladenen HSA-NP.

Für membrangängige PS ist der Nachweis der endozytotischen Aufnahme der Transportsysteme eine gute Methode zur Prüfung der Stabilität der PS-NP-Bindung. Aufgrund der hohen Albuminaffinität und der hohen Konzentration an BSA im Zellkulturmedium wird jedoch auch freies mTHPC endozytotisch aufgenommen, daher kann der Endozytosenachweis für mTHPC-beladene HSA-NP nicht als Beleg für deren Stabilität bewertet werden.

Da es sich bei der adsorptiven Bindung zwischen den HSA-NP und den mTHPC-Molekülen ebenfalls um Wechselwirkungen zwischen Albuminen und mTHPC handelt, ist die Frage nach der Stabilität dieser Bindung besonders relevant. Die hohe Konkurrenz durch das BSA im Medium könnte die Stabilität der PS-NP-Bindung besonders gefährden. Eine spätere klinische Anwendung der mTHPC-beladenen HSA-NP wäre dann aufgrund der hohen Albuminkonzentration im Blut nicht möglich.

Die unterschiedlichen Entwicklungen der Phototoxizität und der intrazellulären Konzentration über die Inkubationszeit von mTHPC-beladenen HSA-NP im Vergleich zu freiem mTHPC (ohne NP) sind deutliche Hinweise darauf, dass hier wirklich mTHPC durch HSA-NP transportiert wurde.

Ob jedoch alle mTHPC-Moleküle bis zur Aufnahme adsorptiv an den NP gebunden bleiben, oder nur der größte Teil, kann über diese Unterschiede jedoch nicht geklärt werden. Daher kann die Frage nach der Stabilität der PS-NP-Bindung mit den hier diskutierten Ergebnissen nicht endgültig geklärt werden.

6.2.2 Einfluss der Quervernetzung der HSA-Monomere auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver HSA-Nanopartikel

Die Quervernetzung der HSA-Monomere mit GB ist nötig, um aus den HSA-Aggregaten stabile HSA-NP zu formen. Die Oberfläche, Größe oder PS-Beladungsrate der HSA-NP sollte durch die Vernetzung nicht beeinflusst werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedlich starke Vernetzung keinen Einfluss auf die erreichbare intrazelluläre PS-Konzentration hat. Diese Beobachtung bestätigt die Aussage, dass die Oberflächenstruktur, Größe oder PS-Beladungsrate der HSA-NP nicht beeinflusst wird.

Die Stärke der Quervernetzung hat aber einen Einfluss auf die Stabilität der Verbindungen zwischen den einzelnen HSA-Monomeren. Diese GB müssen innerhalb der Lysosomen enzymatisch gespalten werden, damit ein vollständiger Abbau der HSA-NP und damit auch eine vollständige Freisetzung der PS stattfinden kann.

Damit beeinflusst die Menge der zur Quervernetzung verwendeten GB die Geschwindigkeit des lysosomalen Abbaus der HSA-NP und der PS-Freisetzung. Diesen Einfluss kann man gut in der Entwicklung der Phototoxizität unterschiedlich quervernetzter Pheo- und mTHPC-beladener HSA-NP nachvollziehen.

Nach längeren Inkubationszeiten (5 h, 24 h) werden mit allen HSA-NP, unabhängig von der Stärke der Quervernetzung, ähnlich hohe Apoptoseraten erreicht. Nach kürzeren Inkubationszeiten (1 h, 3 h) unterscheiden sich die Apoptoseraten in Jurkatzellen, je nach Stärke der Quervernetzung, jedoch stark. Die mit weniger GB quervernetzten HSA40-NP zeigen hier eine stärkere Phototoxizität als die stärker quervernetzten HSA100-NP, welche aber eine stärkere Phototoxizität aufweisen als die sehr stark quervernetzten HSA200-NP. Dieser Effekt kann nicht auf unterschiedlichen intrazellulären PS-Konzentrationen beruhen, da diese sich nicht signifikant unterscheiden.

Durch die CLSM- und FLIM-Messungen und die Bestimmung der intrazellulären $^1\text{O}_2$ -Generierung konnte gezeigt werden, dass die lysosomale Abbaugeschwindigkeit der HSA-NP mit zunehmender Stärke der Quervernetzung abnimmt. Der langsamere Abbauprozess hat zur Folge, dass die PS langsamer ins Zytoplasma freigesetzt werden und damit erst nach längerer Inkubation eine effiziente Verteilung der PS erreicht wird.

Eine zu geringe Quervernetzung der HSA-Monomere birgt jedoch das Risiko instabiler NP und damit das Risiko einer frühzeitigen Freisetzung der PS. Deshalb wurde die Quervernetzung der HSA100-NP als die ideale Vernetzungsstärke bestimmt. Es konnte keine konkrete Instabilität der HSA40-NP nachgewiesen werden. Aber die sehr frühe Freisetzung der PS und die damit bereits nach kurzer Zeit (>1 h) sehr hohe Phototoxizität könnte für die spätere Anwendung am Patienten ein Problem werden. Es sind bereits die ersten PS-Moleküle intrazellulär freigesetzt, während sich wahrscheinlich der größte Teil der mit PS beladenen NP noch im Blutkreislauf befindet.

Eine zu hohe Quervernetzung und die damit verbundene langsame Freisetzung der PS könnte in der *in vivo* Anwendung ebenfalls problematisch werden, weil so Patienten unnötig langen Inkubationszeiten ausgesetzt werden müssen.

6.2.3 Einfluss der Photosensibilisatorbeladungsrate auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver HSA-Nanopartikel

Zur Untersuchung des Einflusses der PS-Beladungsrate wurden zwei verschiedene mTHPC-beladene HSA100-NP untersucht: 18mTHPC-HSA (Beladungsrate: 18,7 µg mTHPC auf 1 mg HSA), und 31mTHPC-HSA (Beladungsrate: 31,8 µg mTHPC auf 1 mg HSA).

An diesen NP wurden im Rahmen dieser Arbeit Phototoxizitätstest an Jurkatzellen und im Rahmen der Doktorarbeit von Kuan Chen [36] Untersuchungen zur photophysikalischen Charakterisierung durchgeführt (siehe Unterunterabschnitt 6.1.3.1).

Bereits die photophysikalischen Untersuchungen zeigten, dass die stärkere Beladung der 31mTHPC-HSA Partikel dazu führt, dass die mTHPC-Moleküle auf der Oberfläche wechselwirken, was zu einer Verminderung der Fähigkeit führt, 1O_2 zu generieren.

Die Phototoxizitätsuntersuchung zeigt, dass nach 24 h Inkubation die Apoptoserate in Jurkatzellen für beide NP gleich hoch ist, nach 1 h, 3 h und 5 h Inkubation ist die Phototoxizität der höher beladenen 31mTHPC-HSA-NP jedoch signifikant geringer. Diese verzögerte Wirksamkeit ist vermutlich auf die Wechselwirkungen der mTHPC-Moleküle untereinander zurückzuführen.

Nach der photophysikalischen Charakterisierung wurde beschlossen mit Partikeln weiterzuarbeiten, welche eine Beladungsrate von ca. 20 µg PS auf 1 mg HSA haben, weil diese Beladungsrate nicht zur PS-Wechselwirkung führt.

Die Idee hinter der stärkeren Beladung war, eventuell eine stärkere Anreicherung, also eine höhere intrazelluläre PS-Konzentration zu erreichen. Alle *in vitro* Experimente zeigen jedoch, dass die Effizienz der Photosensibilisierung nur sehr wenig von der intrazellulären PS-Konzentration abhängt. Der Einfluss des lysosomalen Abbaus der NP und der intrazellulären Freisetzung und Lokalisierung der PS ist sehr viel stärker.

Aus diesen Gründen wurde die Idee höher beladene NP zur stärkeren Anreicherung der PS zu verwenden verworfen. Deshalb sind auch keine weiteren *in vitro* Experimente mit den 31mTHPC-HSA-NP durchgeführt worden.

6.2.4 Stabilität der photoaktiven HSA-Nanopartikel

Die CLSM-Experimente an mTHPP- und Pheo-beladenen HSA-NP weisen deutlich auf deren Stabilität hin. Es konnte gezeigt werden, dass mittels HSA-NP mTHPP und Pheo endozytotisch in die Jurkatzellen gelangt, wogegen die freien PS mTHPP- und Pheo (ohne NP) direkt durch die Zytoplasmamembran in die Zelle gelangen.

Schwieriger ist diese Aussage für mTHPC-beladene HSA-NP zu treffen, da auch freies mTHPC, adsorbiert an Albumine im Nährmedium endozytotisch aufgenommen wird. Unterschiede in der Dynamik der Aufnahme des lysosomalen Abbaus, der intrazellulären mTHPC-Freisetzung und der Phototoxizität lassen aber vermuten, dass auch diese Partikel stabil sind.

Bevor die PS-beladenen HSA-NP jedoch in einer nächsten Untersuchungsphase *in vivo* getestet werden können, sollte deren Stabilität in biologischer Umgebung genauer untersucht werden.

Ein gutes Modell für biologische Umgebung in Voruntersuchungen ist Zellkulturmedium bei 37°C. Das Medium enthält 10 % fötales bovines Serum (FBS). Die Stabilität der Partikel muss jedoch auch in nativem Blut, also einer Umgebung aus 100 %igem Blutplasma gewährleistet sein. Unter *in vivo* Bedingungen sind die NP etwa der 10fachen Proteinkonzentration ausgesetzt. Zusätzlich zur höheren Proteinkonzentration könnte auch der Blutstrom die Stabilität der HSA-NP beeinflussen, dieser Einfluss fällt im Zellkulturmodell komplett weg.

Aus diesen Gründen können auch die Ergebnisse für mTHPP- und Pheo-beladene HSA-NP nur als Hinweis auf Stabilität interpretiert werden.

7 PLGA-Nanopartikel als Transportsysteme für Wirkstoffe in der Photodynamischen Therapie

7.1 *In vitro* Untersuchungen an mit mTHPP beladenen PLGA-Nanopartikeln

In den folgenden Abschnitten sind die *in vitro* Untersuchungen an inkorporativ mit mTHPP beladenen PLGA-NP beschrieben. Diese Untersuchungen dienten dazu, die grundsätzliche Eignung von PLGA-NP als Wirkstoffstransporter für PS zu prüfen.

Detailliertere *in vitro* Untersuchungen sind anhand von PLGA-NP durchgeführt worden, die mit dem klinisch zugelassenem PS mTHPC beladenen wurden. (siehe Abschnitt 7.2 und Abschnitt 7.3)

7.1.1 Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPP-PLGA-Nanopartikeln

Die durch Aufnahme der NP erreichten intrazellulären mTHPP-Konzentrationen im Vergleich zu denen von mTHPP-inkubierten (ohne NP) Jurkatzellen sind in Abbildung 7.1 dargestellt.

Die Inkubation mit mTHPP-PLGA führt zu einer Anreicherung von mTHPP in den Jurkatzellen. Die intrazelluläre mTHPP-Konzentration nach 3 h, 5 h und 24 h Inkubation mit mTHPC-PLGA ist etwas geringer als die mit freiem mTHPP inkubierten Zellen. Nur die 1 h mit mTHPP-PLGA inkubierten Zellen weisen eine höhere intrazelluläre mTHPP-Konzentration auf als die mit freiem mTHPP inkubierten Zellen. Nach 24 h Inkubation wird eine intrazelluläre mTHPP-Konzentration von $1,0 \text{ mM} \pm 0,2 \text{ mM}$ erreicht, im Vergleich dazu wird durch Inkubation mit freiem mTHPP eine intrazelluläre mTHPP-Konzentration von $1,3 \text{ mM} \pm 0,2 \text{ mM}$ erreicht.

Im Vergleich zu den mTHPP beladenen HSA-NP (siehe Abbildung 6.1) ist die intrazelluläre mTHPP-Anreicherung mit mTHPP-PLGA deutlich effizienter. Die PLGA-NP sind im Gegensatz zu den adsorptiv beladenen HSA-NP inkorporativ beladen. Die mTHPP-Moleküle sind also innerhalb der NP nach aussen abgeschirmt durch PLGA-Polymere.

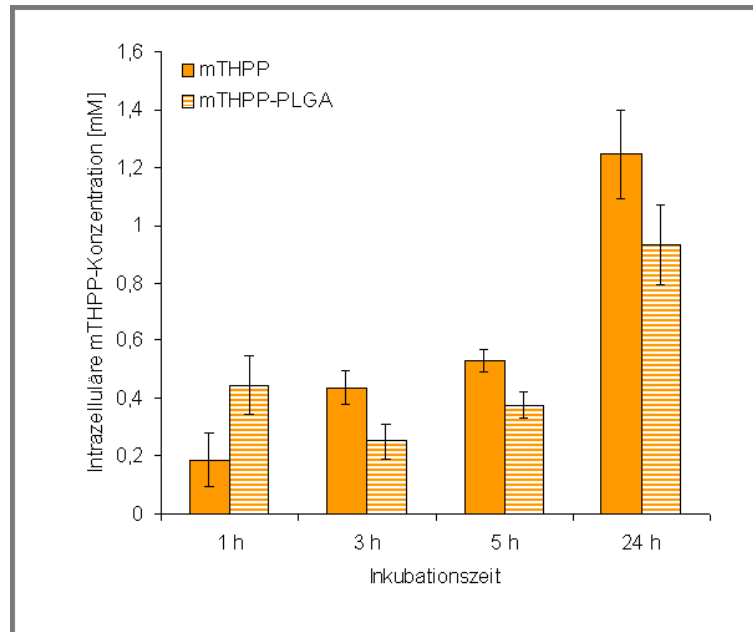


Abbildung 7.1: Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPP und mTHPP-PLGA, in Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

7.1.2 Endozytotische Aufnahme mTHPP-beladener PLGA-Nanopartikel - Nachweis mittels CLSM

Im Folgenden wurde die endozytotische Aufnahme der mTHPP-beladenen PLGA-NP untersucht. Die CLSM-Bilder der mit freiem mTHPP, beziehungsweise mTHPP-PLGA inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.2 dargestellt.

Die Messung zeigt, dass das mTHPP in allen Proben innerhalb der Zellen, im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert ist. Im Bereich des Zellkerns, oder ausserhalb mit der Zytoplasmamembran assoziiert, ist kein mTHPP zu finden.

Wie bereits in Unterunterabschnitt 6.1.4.1 beschrieben, ist in mit mTHPP (ohne NP) inkubierten Zellen keine Lokalisation von mTHPP in Endosomen oder Lysosomen und damit kein endozytotischer Prozess bei der Aufnahme zu erkennen.

Im Kontrast dazu zeigen die 1 h mit mTHPP-PLGA inkubierten Jurkatzellen eine starke Kolokalisation von LysoSensor green (grün) und mTHPP (rot). Nach bereits 3 h Inkubation mit mTHPP-PLGA sind schon deutlich mehr nicht kolokalisierte mTHPP- und LysoSensor green-Signale neben den gelben Kolokalisationssignalen zu erkennen. Nach 24 h Inkubation unterscheidet sich die Verteilung der mTHPP-Fluoreszenz deutlich von der Verteilung der LysoSensor green-Fluoreszenz, hier ist keine Kolokalisation mehr detektierbar.

Diese Messung zeigt eindeutig, dass mTHPP-PLGA im Gegensatz zu freiem mTHPP (ohne NP) endozytotisch aufgenommen wird. Daher kann davon ausgegangen werden,

7.1 *In vitro* Untersuchungen an mit mTHPP beladenen PLGA-Nanopartikeln

dass die adsorptive Bindung zwischen mTHPP und PLGA stabil ist und keine mTHPP-Moleküle vor der Aufnahme in die Jurkatzellen freigesetzt werden.

Die lysosomale Freisetzung findet zum größten Teil bereits zwischen 1 h und 3 h Inkubation statt.

Damit ist die lysosomale Freisetzung von in PLGA-NP inkorporiertem mTHPP deutlich schneller als die Freisetzung von an HSA-NP adsorbiertem mTHPP.

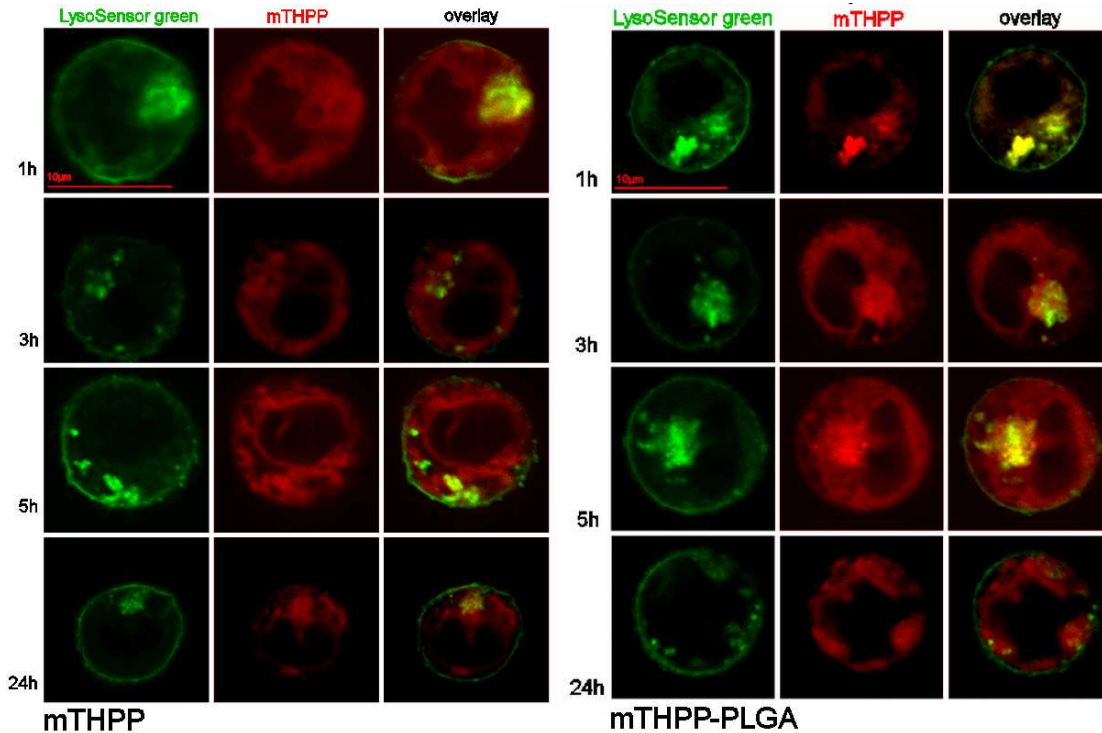


Abbildung 7.2: CLSM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPP und mTHPP-PLGA. Die Endosomen und Lysosomen der Zellen wurden mit LysoSensor green markiert (grüne Fluoreszenz), die rote Fluoreszenz stammt vom mTHPP. Gelbe Signale im Overlay charakterisieren die Kolo-kalisation beider Fluoreszenzen. Anregungswellenlänge für beide Farbstoffe: $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$. Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$).

7.1.3 Lysosomaler Abbau der mTHPP-beladenen PLGA-Nanopartikel und Freisetzung des mTHPP -Nachweis mittels FLIM

Im folgenden Abschnitt werden die FLIM-Untersuchungen an mTHPP-PLGA-NP im Vergleich zu freiem mTHPP (ohne NP) beschrieben. Die FLIM-Bilder und die dazugehörigen Histogramme über die Häufigkeit der in den Bildern gemessenen Fluoreszenzlebensdauern der mit mTHPP und mTHPP-PLGA inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.3

dargestellt.

Die Ergebnisse und deren Beschreibung der FLIM-Bilder und Histogramme der mit mTHPP (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen sind in Unterunterabschnitt 6.1.4.3 und Abbildung 6.12 zu finden.

Die 1 h mit mTHPP-PLGA inkubierten Jurkatzellen zeigen eine sehr breite Verteilung der Fluoreszenzlebensdauern. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer liegt hier zwischen 7,5 ns und 8,5 ns, eine genauere Bestimmung ist angesichts der Breite und Streuung der Kurve nicht möglich. Mit fortschreitender Inkubationszeit werden die Histogrammkurven schmaler. Die mittleren Fluoreszenzlebensdauern verkürzen sich im weiteren Verlauf der Inkubationszeit von etwa 9,3 ns (3 h und 5 h) auf etwa 8,8 ns (24 h).

Die starke Veränderung der Kurvenform der Histogramme zwischen 1 h und 3 h Inkubation spiegelt sich auch in der farbcodierten fluoreszenzmikroskopischen Abbildung der Zellen wider. Die deutlich kürzere, durch blaue Bildpunkte dargestellte, Fluoreszenzlebensdauer spricht für ein Quenching durch Wechselwirkungen der mTHPP-Moleküle. Dieses kann durch den geringen Abstand der in den PLGA-NP inkorporierten Moleküle verursacht werden. Die Verschiebung zu längeren Fluoreszenzlebensdauern hin wird durch die Freisetzung der mTHPP-Moleküle verursacht.

Die von Kuan Chen gemessene Verschiebung der mTHPP-Triplettelebensdauern in mit mTHPP-PLGA inkubierten Jurkatzellen belegt ebenfalls die Freisetzung der mTHPP-Moleküle von den NP zwischen 1 h und 3 h Inkubation (siehe Tabelle 8).

Die erneute Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauern nach 24 h Inkubation mit mTHPP-PLGA wird durch eine intrazelluläre Umverteilung der mTHPP-Moleküle verursacht. Dieser Effekt ist auch in den mit freiem mTHPP (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen sichtbar.

In den mTHPP-PLGA-Molekülen befinden sich die mTHPP-Moleküle inkorporiert innerhalb der NP. Damit können sie vor der lysosomalen Freisetzung nicht mit zellulären Bestandteilen wechselwirken. Auf diese Weise sind inhibitorische Effekte auf aktive zelluläre Prozesse wie die endozytische Aufnahme und den lysosomalen Abbau ausgeschlossen.

Dies wird nicht nur durch die hier dargestellten FLIM-Messungen, sondern auch durch die CLSM-Messungen (siehe Unterunterabschnitt 6.1.4.1, Abbildung 6.9) und die Quantifizierung der Aufnahme (siehe Unterunterabschnitt 6.1.1.1, Abbildung 6.1) bestätigt.

7.1.4 Dunkeltoxizität und Phototoxizität von mTHPP beladenen PLGA-Nanopartikeln

Die Ergebnisse der Dunkeltoxizitätstests an mTHPP-PLGA und unbeladenen PLGA-NP im Vergleich zu mTHPP (ohne NP) sind in Abbildung 7.4 dargestellt.

Die Totzellrate der mit mTHPP (siehe auch Unterunterabschnitt 4.1.4.2), mTHPP-PLGA und PLGA inkubierten Jurkatzellen liegen alle zwischen 1 % und 5 %. Auch die Totzellraten der nicht inkubierten Zellen (Ref) liegen in diesem Bereich. Es konnten weder für die mTHPP-beladenen NP (mTHPP-PLGA) noch für die unbeladenen NP toxische Effekte auf unbestrahlte Jurkatzellen beobachtet werden.

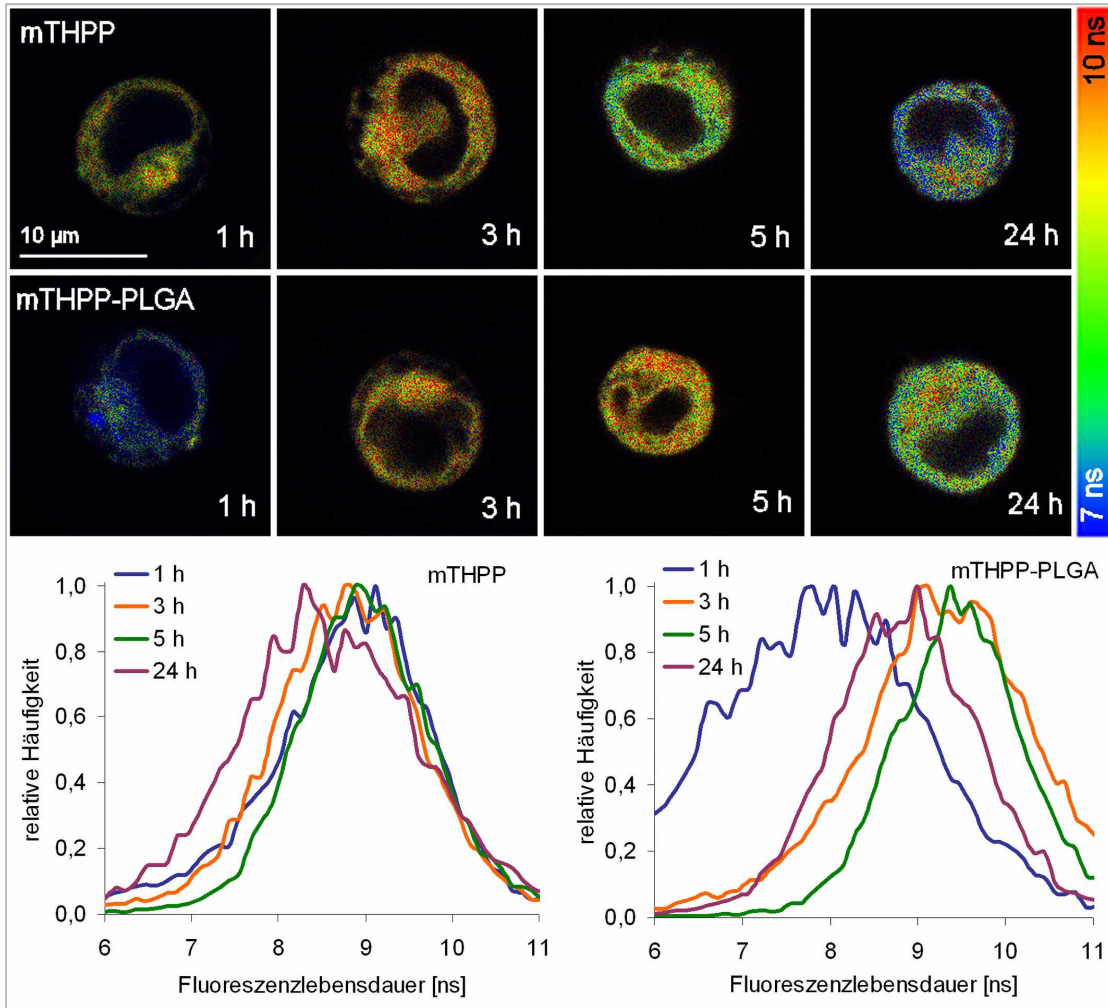


Abbildung 7.3: FLIM-Bilder von Jurkatzellen 1 h, 3 h, 5 h und 24 h inkubiert mit mTHPP und mTHPP-PLGA. Fluoreszenzanregung mit einem gepulsten ns-Laser ($\lambda_{ex} = 440$ nm). Die in jedem Bildpunkt gemessenen Fluoreszenzlebensdauern sind farbcodiert dargestellt (siehe Farbskala). Die Histogramme (unten) zeigen die relative Häufigkeit der in je 4 verschiedenen Zellen gemessenen Fluoreszenzlebensdauern.

Die Ergebnisse der Phototoxizitätstests an mTHPP-PLGA und unbeladenen PLGA-NP im Vergleich zu mTHPP (ohne NP) sind in Abbildung 7.5 dargestellt.

Es konnte für unbeladene PLGA-NP (gemessen nach 3 h und 24 h) keine Phototoxizität festgestellt werden, dies bestätigt unsere Erwartung. Eine genauere Betrachtung von mTHPP (ohne NP) ist in Unterunterabschnitt 4.1.4.2 zu finden.

Die Phototoxizität von mTHPP-PLGA ist sehr gering. Nach 1 h Inkubation mit mTHPP-PLGA ist kein phototoxischer Effekt detektierbar. Auch nach 3 h Inkubation

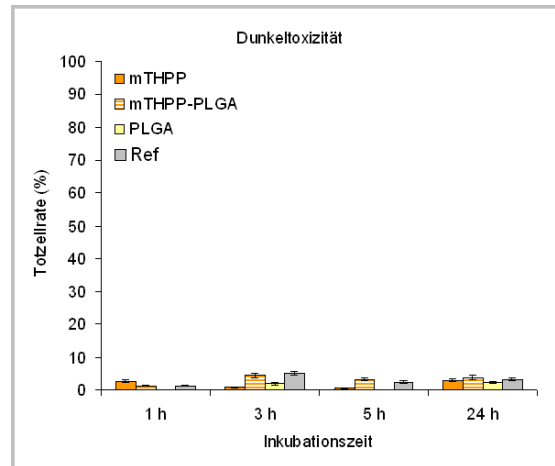


Abbildung 7.4: Dunkeltoxizität von mTHPP, mTHPP-PLGA, PLGA und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

liegen die Apoptoserate mit $4,3 \% \pm 0,7 \%$ und die Nekroserate mit $0,8 \% \pm 0,1 \%$ im Rahmen der Dunkeltoxizität und damit im Bereich normalen Zellsterbens. Erst nach 5 h Inkubation mit mTHPP-PLGA konnten sowohl eine erhöhte Apoptoserate ($9 \% \pm 1 \%$) als auch eine erhöhte Nekroserate ($9 \% \pm 1 \%$) gemessen werden. Nach 24 h Inkubation mit mTHPP-PLGA steigt die Phototoxizität. Die Apoptoserate steigt auf ($25 \% \pm 4 \%$), die Nekroserate sinkt jedoch geringfügig auf ($6 \% \pm 1 \%$).

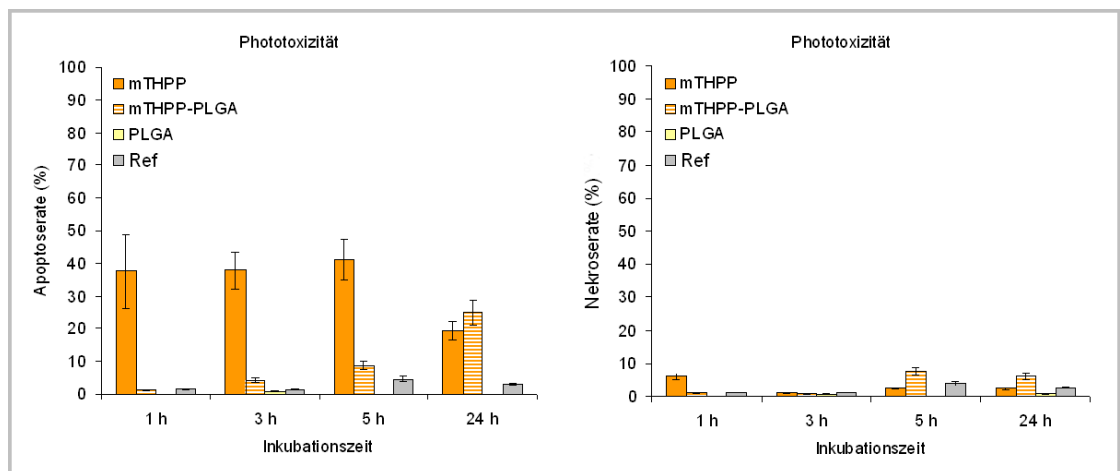


Abbildung 7.5: Phototoxizität von mTHPP, mTHPP-PLGA, PLGA und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Links ist die Apoptoserate, rechts die Nekroserate dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die intrazelluläre mTHPP-Konzentration von mit mTHPP-PLGA inkubierten Jurkatzellen ist zwar etwas geringer als die von mit mTHPP (ohne NP) inkubierten Zellen, jedoch ist sie nach 24 h mit fast 1 mM trotzdem sehr hoch. Die geringe Phototoxizität der mTHPP-PLGA-NP ist daher nicht mit der intrazellulären mTHPP-Konzentration zu erklären.

Der lysosomale Abbau und die damit verbundene intrazelluläre Freisetzung von mTHPP ist erst in der 24 h inkubierten Probe abgeschlossen. Das erklärt den Anstieg der Phototoxizität nach 24 h Inkubationszeit.

Die trotzdem sehr geringe Effizienz der Photosensibilisierung mittels mTHPP-PLGA sowie auch mittels mTHPP (ohne NP) lässt sich mit der sehr geringen Absorption von mTHPP im Bereich der Q-Banden erklären (siehe Abbildung 4.2), vor allem im Vergleich zur stärkeren Absorption des mTHPC, welches eine deutlich bessere Effizienz in der Photosensibilisierung von Jurkatzellen aufweist.

7.2 *In vitro* Untersuchungen an adsorptiv und inkorporativ mit mTHPC beladenen PLGA-Nanopartikeln

In den folgenden Abschnitten sind die *in vitro* Untersuchungen an mit mTHPC beladenen PLGA-NP beschrieben. Die PLGA-NP können auf unterschiedliche Weise mit mTHPC beladen werden.

Eine Möglichkeit ist die inkorporative Beladung. Dazu wird das mTHPC bereits während der Synthese der PLGA-NP dazu gegeben. Durch adsorptive Wechselwirkungen mit dem PLGA lagern sich die mTHPC-Moleküle in die NP ein.

Die zweite Möglichkeit ist die adsorptive Beladung. Hierfür wird das mTHPC erst zu den fertig synthetisierten PLGA-NP gegeben. Durch adsorptive Wechselwirkungen mit dem PLGA lagern sich die mTHPC-Moleküle auf der Oberfläche der NP an.

Eine dritte Möglichkeit besteht darin, beide Beladungsstrategien miteinander zu kombinieren. Es entstehen mTHPC-PLGA-NP welche sowohl inkorporativ als auch adsorptiv mit mTHPC beladen sind. Mit dieser Variante ist es möglich eine deutlich höhere Beladungsrate der PLGA-NP zu erzielen.

7.2.1 Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPC-PLGA-Nanopartikeln mit unterschiedlichen Beladungsstrategien

Die mit mTHPC beladenen PLGA-NP sind inkorporativ (mTHPC-PLGAⁱ), adsorptiv (mTHPC-PLGA^a) oder sowohl inkorporativ als auch adsorptiv (mTHPC-PLGA^{ia}) mit mTHPC beladen. Die durch Aufnahme der NP erreichten intrazellulären mTHPC-Konzentrationen im Vergleich zu denen von mTHPC-inkubierten (ohne NP) Jurkatzellen sind in Abbildung 7.6 dargestellt.

Die Inkubation mit mTHPC-beladenen PLGA-NP führt zu einer Anreicherung von mTHPC in Jurkatzellen. Nach 5 h und 24 h Inkubation ist in der intrazellulären mTHPC-Konzentration der mit mTHPC-PLGA^{ia}, mTHPC-PLGAⁱ und mTHPC-PLGA^a inkubierten Zellen kein signifikanter Unterschied zu den mTHPC-inkubierten (ohne NP) Zellen

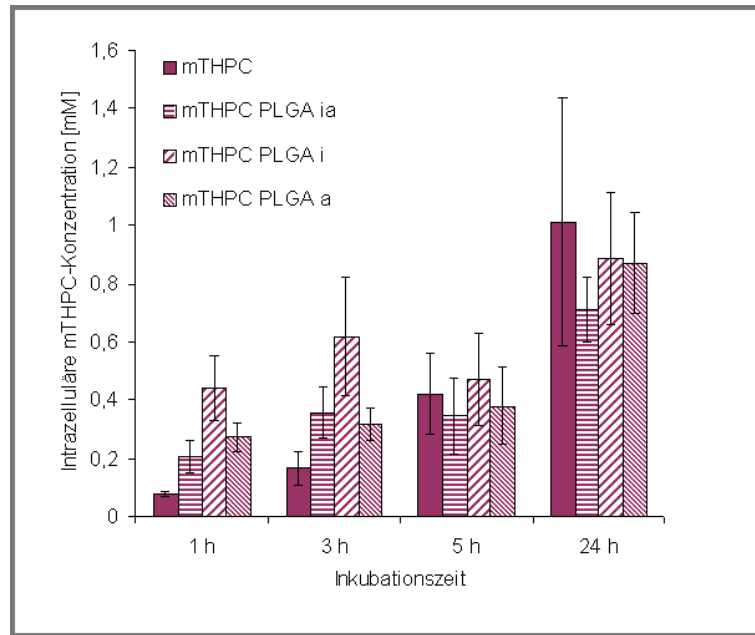


Abbildung 7.6: Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPC, mTHPC-PLGA ia , mTHPC-PLGA i und mTHPC-PLGA a , in Jurkatzellen nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h Inkubation. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

messbar. Nach 1 h und 3 h Inkubation ist die intrazelluläre mTHPC-Konzentration der mit mTHPC-PLGA ia , mTHPC-PLGA i und mTHPC-PLGA a inkubierten Zellen sogar höher als die der mTHPC-inkubierten (ohne NP) Zellen.

Besonders die Probe mTHPC-PLGAⁱ zeigt in den ersten 3 h Inkubation signifikant höhere intrazelluläre mTHPC-Konzentrationen ($0,6 \text{ mM} \pm 0,2 \text{ mM}$ (mTHPC-PLGAⁱ) verglichen mit $0,3 \text{ mM} \pm 0,1 \text{ mM}$ (mTHPC-PLGA^a und mTHPC-PLGA^{ia}) und $0,16 \text{ mM} \pm 0,05 \text{ mM}$ (mTHPC)). Die Probe mTHPC-PLGA^a ist die einzige NP-Probe auf deren Oberfläche sich keine PS befinden, alle mTHPC-Moleküle befinden sich im Inneren der Partikel durch PLGA-Polymere abgeschirmt.

Die Beladung der mTHPC-PLGA^{ia}-NP ist mit $32 \text{ } \mu\text{g}/\text{mg}$ deutlich höher als die der mTHPC-PLGAⁱ- ($18 \text{ } \mu\text{g}/\text{mg}$) und mTHPC-PLGA^a-NP ($20 \text{ } \mu\text{g}/\text{mg}$). Trotzdem wird mit allen drei NP und frei appliziertem mTHPC nach 24 h eine intrazelluläre mTHPC-Konzentration zwischen $0,8 \text{ mM}$ und $1,0 \text{ mM}$ erreicht. Das spricht dafür, dass dies die maximal mögliche intrazelluläre mTHPC-Konzentration in Jurkatzellen ist.

7.2.2 Dunkeltoxizität und Phototoxizität von mTHPC beladenen PLGA-Nanopartikeln mit verschiedenen Beladungsstrategien

Die Ergebnisse der Dunkeltoxizitätstests an mit mTHPC-PLGA^{ia}, mTHPC-PLGAⁱ, mTHPC-PLGA^a im Vergleich zu mit mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.7 dargestellt.

Die Totzellrate der mit mTHPC (siehe auch Unterunterabschnitt 4.1.4.2), mTHPC-PLGA^{ia}, mTHPC-PLGAⁱ, mTHPC-PLGA^a inkubierten Jurkatzellen liegen alle unter 3 %. Auch die Totzellraten der nicht inkubierten Zellen (Ref) liegen in diesem Bereich. Es konnten für keine der Proben toxische Effekte an unbestrahlten Zellen festgestellt werden.

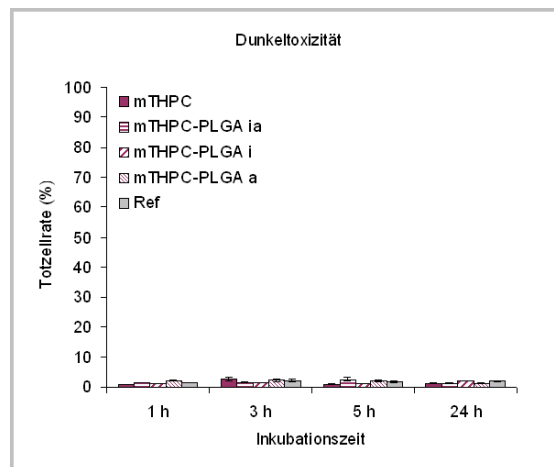


Abbildung 7.7: Dunkeltoxizität von mTHPC, mTHPC-PLGA^{ia}, mTHPC-PLGAⁱ, mTHPC-PLGA^a und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die Ergebnisse der Phototoxizitätstests an mit mTHPC-PLGA^{ia}, mTHPC-PLGAⁱ, mTHPC-PLGA^a im Vergleich zu mit mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.8 dargestellt.

Genau wie mit mTHPC (ohne NP) (siehe Unterunterabschnitt 4.1.4.2) wird auch in mit mTHPC-PLGA^{ia}, mTHPC-PLGAⁱ, mTHPC-PLGA^a inkubierten und bestrahlten Jurkatzellen eine sehr hohe Phototoxizität erreicht.

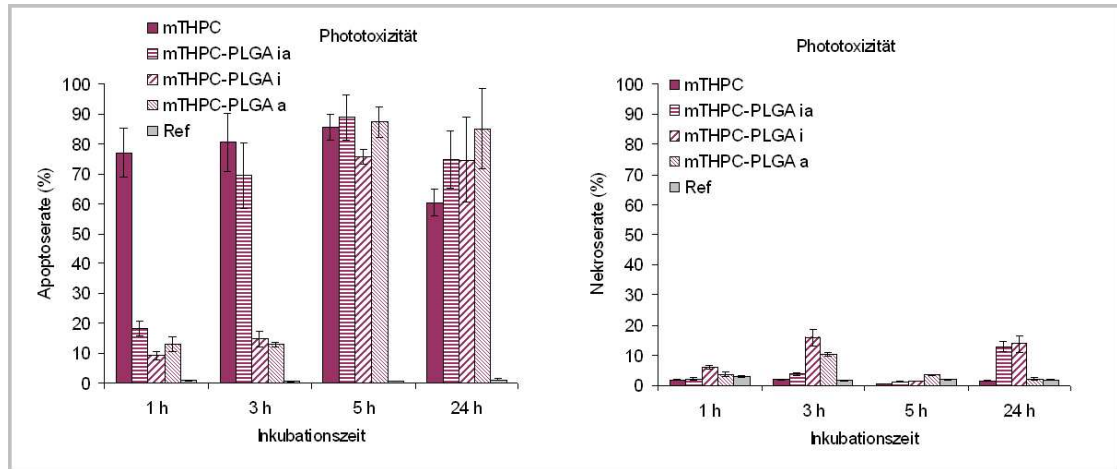


Abbildung 7.8: Phototoxizität von mTHPC, mTHPC-PLGA^{ia}, mTHPC-PLGAⁱ, mTHPC-PLGA^a und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Nach 1 h Inkubation mit den mit mTHPC beladenen PLGA-NP sind die Apoptoseraten noch sehr viel geringer als nach 1 h Inkubation mit mTHPC.

Nach 3 h Inkubation mit mTHPC-PLGA^{ia} steigt die Apoptoserate bereits auf 69 % ± 11 % und liegt damit schon im Bereich der mit mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen (80 % ± 10 %). Die mit mTHPC-PLGAⁱ, mTHPC-PLGA^a 3 h inkubierten Jurkatzellen weisen mit einer Apoptoserate von 15 % ± 1 % und 13 % ± 1 % jedoch noch eine deutlich geringere Phototoxizität auf. Die 3 h mit mTHPC-PLGAⁱ, mTHPC-PLGA^a inkubierten Zellen weisen dagegen signifikant erhöhte Nekroseraten auf (16 % ± 3 % und 10 % ± 1 %) auf. Damit ist die Phototoxizität dieser beiden Proben nach 3 h Inkubation zwar noch deutlich geringer als die von mit mTHPC-PLGA^a und mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen, aber auch bereits deutlich erhöht.

Nach 5 h Inkubation erreichen alle Proben ihr Maximum an Phototoxizität. Die Apoptoserate von 5 h mit mTHPC-PLGA^{ia} inkubierten Zellen beträgt 89 % ± 8 %. Die Apoptoserate von 5 h mit mTHPC-PLGAⁱ inkubierten Zellen beträgt 76 % ± 2 %. Die Apoptoserate von 5 h mit mTHPC-PLGA^a inkubierten Zellen beträgt 87 % ± 5 %. Damit liegen mTHPC-PLGA^{ia} und mTHPC-PLGA^a NP-Proben im Bereich von 5 h mit mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen (86 % ± 4 %). Die Apoptoserate von 5 h mit mTHPC-PLGAⁱ inkubierten Jurkatzellen ist nur geringfügig geringer.

Der Abfall der Phototoxizität nach 24 h, der für mit mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen beobachtet wurde, tritt für die mit mTHPC-PLGA^{ia}, mTHPC-PLGAⁱ und mTHPC-PLGA^a inkubierten Jurkatzellen nicht auf. Die Apoptoserate von 24 h mit mTHPC-PLGA^a inkubierten Jurkatzellen bleibt mit 85 % ± 13 % sehr hoch. Die Apop-

toseraten von 24 h mit mTHPC-PLGA^{ia} und mTHPC-PLGAⁱ inkubierten Jurkatzellen fällt zwar etwas ab ($75 \% \pm 11 \%$ und $75 \% \pm 14 \%$), aber dafür ist für diese Proben eine deutlich erhöhte Nekroserate zu beobachten ($13 \% \pm 2 \%$ und $14 \% \pm 3 \%$).

Die drei verschiedenen PLGA-NP Systeme unterscheiden sich nicht nur in der Beladungsstrategie (inkorporiertes gebundenes mTHPC (mTHPC-PLGAⁱ), adsorptiv gebundenes mTHPC (mTHPC-PLGA^a)), sondern auch in der Beladungsrate. mTHPC-PLGA^{ia} transportiert mit $32 \mu\text{g}/\text{mg}$ (mTHPC/PLGA) deutlich mehr mTHPC als mTHPC-PLGAⁱ mit $18 \mu\text{g}/\text{mg}$ und mTHPC-PLGA^a mit $20 \mu\text{g}/\text{mg}$. Die Unterschiede in der zeitlichen Entwicklung der Phototoxizität können daher nicht auf die Beladungsstrategie reduziert werden.

Nach 1 h und 3 h Inkubation ist die intrazelluläre mTHPC-Konzentration von mit mTHPC-PLGAⁱ inkubierten Jurkatzellen am höchsten (siehe Unterabschnitt 7.2.1 Abbildung 7.6), trotzdem ist die Phototoxizität nach 3 h Inkubation mit mTHPC-PLGAⁱ deutlich geringer als nach 3 h Inkubation mit mTHPC-PLGA^{ia}. Offensichtlich ist die höhere Beladung vor allem in den ersten Stunden der Inkubation von Vorteil. Beim lysosomalen Abbau der stark beladenen PLGA-NP kann in kürzerer Zeit mehr mTHPC ins Zytoplasma freigesetzt werden, während die deutlich größere Menge an mittels mTHPC-PLGAⁱ und mTHPC-PLGA^a transportiertem mTHPC nach 3 h noch zum größten Teil mit den NP in den Lysosomen lokalisiert ist.

7.3 *In vitro* Untersuchungen an modifizierten mit mTHPC beladenen PLGA-Nanopartikeln

In den folgenden Abschnitten sind *in vitro* Untersuchungen an mit mTHPC beladenen PLGA-NP beschrieben.

Die hier untersuchten PLGA-NP wurden für ein aktives Targeting mit den AK IgG (mTHPC-PLGA-IgG) und Erbitux (mTHPC-PLGA-Erb) modifiziert. Zur kovalenten Bindung der AK an die NP wurde PEG verwendet. Zur Überprüfung des Einflusses der PEGulierung auf die Funktionalität der NP wurde auch eine nur mit PEG modifizierte Probe (mTHPC-PLGA-PEG) untersucht.

7.3.1 Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von unterschiedlich modifizierten mTHPC-PLGA-Nanopartikeln

Die durch Aufnahme der modifizierten NP erreichten intrazellulären mTHPC-Konzentrationen im Vergleich zu denen, von mit unmodifizierten mTHPC-PLGA^a-NP und mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.9 dargestellt.

Die Inkubation mit mTHPC-beladenen AK-modifizierten PLGA-NP führt zu einer Anreicherung von mTHPC in Jurkatzellen. Jedoch sind die erreichten intrazellulären mTHPC-Konzentrationen für alle Inkubationszeiten mit diesen Proben signifikant geringer, als die der mit mTHPC-PLGA^a und mit freiem mTHPC inkubierten (ohne NP) Jurkatzellen.

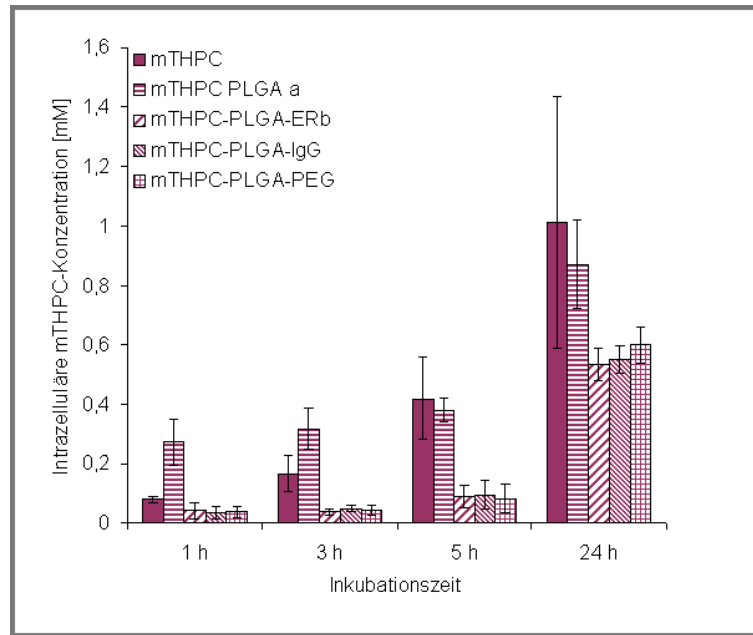


Abbildung 7.9: Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPC, mTHPC-PLGA, mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-PEG in Jurkatzellen nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h Inkubation. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

In den ersten 5 h der Inkubationszeit ist kaum eine intrazelluläre mTHPC-Anreicherung zu beobachten. Nach 5 h Inkubation wird mit den modifizierten NP nur eine intrazelluläre mTHPC-Konzentration von $0,10 \text{ mM} \pm 0,05 \text{ mM}$ erreicht. Erst nach 24 h Inkubation steigt die intrazelluläre mTHPC-Konzentration signifikant auf $0,6 \text{ mM} \pm 0,1 \text{ mM}$. Aber auch diese Konzentration liegt deutlich unter der mit unmodifizierten NP und freiem mTHPC erreichten (zwischen $0,8 \text{ mM}$ und $1,0 \text{ mM}$).

Der Effekt der verlangsamten Aufnahme der modifizierten NP ist unabhängig von der Art der Modifikation. Daher ist anzunehmen, dass bereits die PEGulierung der NP die endozytotische Aufnahme erschwert.

IgG ist ein unspezifischer AK und wird daher als Positivkontrolle verwendet. Erb ist ein spezifischer AK gegen EGFR welcher bei vielen Krebszellarten überexprimiert wird. Dies ist jedoch bei Jurkatzellen nicht der Fall. HT29-Zellen überexprimieren EGFR deshalb wurde die intrazelluläre Aufnahme der modifizierten mTHPC-PLGA-Nanopartikel auch in HT29-Zellen bestimmt (siehe Unterabschnitt 7.3.2).

7.3.2 Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von unterschiedlich modifizierten mTHPC-PLGA-Nanopartikeln in HT29-Zellen

HT29-Zellen überexprimieren EGFR, welcher mit dem AK Erbitux interagiert. Deshalb sind diese Zellen für eine zweite Untersuchung der intrazellulären Aufnahme der modifizierten, mTHPC-beladenen PLGA-NP ausgewählt worden.

Die durch Aufnahme der modifizierten NP erreichten intrazellulären mTHPC-Konzentrationen im Vergleich zu denen mit nicht modifizierten NP-(mTHPC-PLGA^a) und mTHPC-inkubierten (ohne NP) HT29-Zellen sind in Abbildung 7.10 dargestellt.

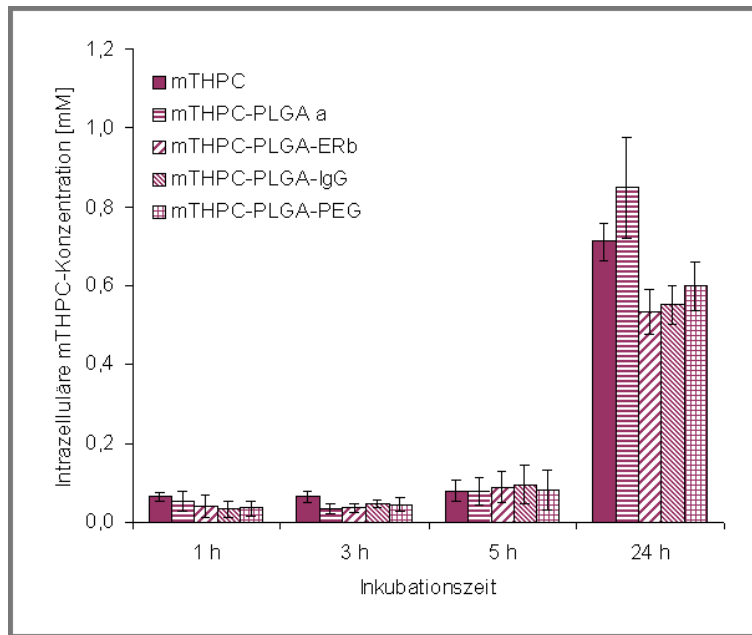


Abbildung 7.10: Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme von mTHPC, mTHPC-PLGA, mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-PEG, in HT29-Zellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Die Aufnahmedynamik in HT29-Zellen unterscheidet sich von der von Jurkatzellen. In den ersten 5 h Inkubation ist die intrazelluläre mTHPC-Anreicherung in HT29-Zellen für alle Proben sehr gering ($0,10 \text{ mM} \pm 0,04 \text{ mM}$). Erst nach 24 h Inkubation ist eine deutliche Anreicherung von mTHPC in den HT29-Zellen messbar. Die modifizierten NP sind in der Lage mTHPC in HT29-Zellen anzureichern, jedoch in signifikant geringerem Maße als die unmodifizierten NP ($0,6 \text{ mM} \pm 0,1 \text{ mM}$ verglichen mit $0,9 \text{ mM} \pm 0,2 \text{ mM}$).

Auch für die HT29-Zellen scheint die Modifizierung der NP die endozytotische Aufnahme zu erschweren.

Um eine Aussage über mögliches aktives Targeting mittels der AK zu treffen müssten *in vivo* Experimente durchgeführt werden.

7.3.3 Endozytotische Aufnahme mTHPC-beladener PLGA-Nanopartikel - Nachweis mittels CLSM

Im Folgenden wurde die endozytotische Aufnahme der mTHPC-beladenen PLGA-NP untersucht. Die CLSM- und Streulichtbilder der mit mTHPC-PLGA inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.11 dargestellt.

Die Messung zeigt, dass das mTHPC in allen Proben innerhalb der Zellen, im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert ist. Im Bereich des Zellkerns, oder ausserhalb mit der Zytoplasmamembran assoziiert, ist kein mTHPC zu finden.

Die mit mTHPC-PLGA inkubierten Jurkatzellen zeigen nach 1 h Inkubation eine starke Kolokalisation von LysoSensor green (grün) und mTHPC (rot). Nach bereits 3 h Inkubation mit mTHPC-PLGA ist fast keine Kolokalisation mehr detektierbar. Nach 5 h und 24 h Inkubation unterscheidet sich die Verteilung der mTHPC-Fluoreszenz deutlich von der Verteilung der LysoSensor green-Fluoreszenz, hier ist keine Kolokalisation mehr detektierbar.

Diese Messung zeigt eindeutig, dass mTHPC-PLGA endozytotisch aufgenommen wird. Die lysosomale Freisetzung findet zum größten Teil bereits zwischen 1 h und 3 h Inkubation statt.

Damit ist die lysosomale Freisetzung etwas schneller als die Freisetzung von mTHPC welches mittels HSA-NP in die Zellen transportiert wurde. Im Unterschied zu mTHPC-HSA, bei welchem die mTHPC-Moleküle auf der Oberfläche der NP liegen, sind die mTHPC-Moleküle in den PLGA-NP inkorporiert. Damit können die mTHPC-Moleküle nicht mit zellulären Bestandteilen wechselwirken. Dieser Effekt ist bei Weitem nicht so stark sichtbar wie bei mTHPP-beladenen NP, scheint aber auch bei mit mTHPC-beladenen NP eine Rolle zu spielen.

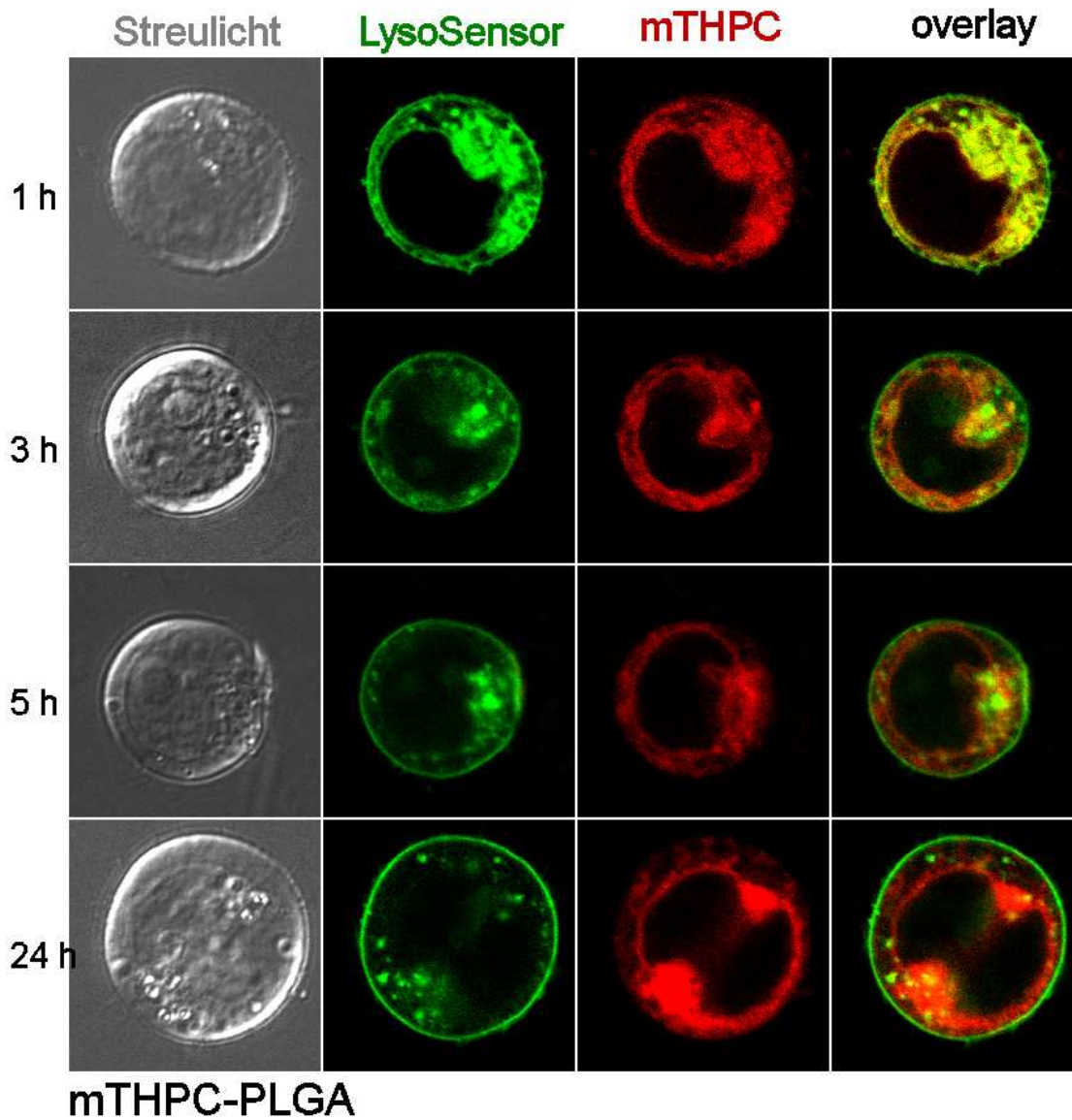


Abbildung 7.11: CLSM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPC-PLGAⁱ. Die Endosomen und Lysosomen der Zellen wurden mit LysoSensor green markiert (grüne Fluoreszenz), die rote Fluoreszenz stammt vom mTHPC. Gelbe Signale im Overlay charakterisieren die Kolokalisation von mTHPC und LysoSensor green. Anregungswellenlänge für beide Farbstoffe: $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$. Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$).

7.3.4 Endozytische Aufnahme mTHPC-beladener, Immunglobulin G-modifizierter PLGA-Nanopartikel -Nachweis mittels CLSM

Im Folgenden wurde die endozytische Aufnahme der mTHPC-beladenen, IgG-modifizierten PLGA-NP (mTHPC-PLGA-IgG) untersucht. Die CLSM- und Streulichtbilder mit mTHPC-PLGA-IgG inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.12 dargestellt.

Die Messung zeigt, dass das mTHPC in allen Proben innerhalb der Zellen, im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert ist. Im Bereich des Zellkerns, oder ausserhalb mit der Zytoplasmamembran assoziiert, ist kein mTHPC zu finden.

Die mit mTHPC-PLGA-IgG inkubierten Jurkatzellen zeigen nach 1 h Inkubation eine starke Kolokalisation von LysoSensor green und mTHPC. Bereits nach 3 h Inkubation mit mTHPC-PLGA ist fast keine Kolokalisation mehr detektierbar. Nach 5 h und 24 h Inkubation unterscheidet sich die Verteilung der mTHPC-Fluoreszenz deutlich von der Verteilung der LysoSensor green-Fluoreszenz, hier ist keine Kolokalisation mehr detektierbar.

Diese Messung zeigt, dass mTHPC-PLGA-IgG endozytisch aufgenommen wird. Die lysosomale Freisetzung findet zum größten Teil bereits zwischen 1 h und 3 h Inkubation statt.

Damit verhält sich endozytisiertes mTHPC-PLGA-IgG genauso wie die nicht modifizierten mTHPC-PLGA-NP.

7.3.5 Endozytische Aufnahme mTHPC-beladener, Erbitux modifizierter PLGA-Nanopartikel -Nachweis mittels CLSM

Im Folgenden wurde die endozytische Aufnahme der mTHPC-beladenen, Erb-modifizierten PLGA-NP untersucht. Die CLSM- und Streulichtbilder der mit mTHPC-PLGA-Erb inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.13 dargestellt.

Die Messung zeigt, dass das mTHPC in allen Proben innerhalb der Zellen, im Bereich des Zytoplasmas lokalisiert ist. Im Bereich des Zellkerns, oder ausserhalb mit der Zytoplasmamembran assoziiert, ist kein mTHPC zu finden.

Die mit mTHPC-PLGA-Erb inkubierten Jurkatzellen zeigen nach 1 h Inkubation eine starke Kolokalisation von LysoSensor green und mTHPC. Nach 3 h und 5 h Inkubation mit mTHPC-PLGA-Erb ist sowohl in den Endosomen und Lysosomen lokalisiertes mTHPC als auch in anderen Bereichen des Zytoplasmas verteiltes mTHPC detektierbar. Nach 24 h Inkubation unterscheidet sich die Verteilung der mTHPC-Fluoreszenz deutlich von der Verteilung der LysoSensor green-Fluoreszenz, hier ist keine Kolokalisation mehr detektierbar.

Diese Messung zeigt, dass mTHPC-PLGA-Erb endozytisch aufgenommen wird. Die lysosomale Freisetzung findet zum größten Teil zwischen 3 h und 5 h Inkubation statt.

Damit scheint die lysosomale Freisetzung des mTHPC von den Erbitux-modifizierten PLGA-NP etwas langsamer vorstatten zu gehen.

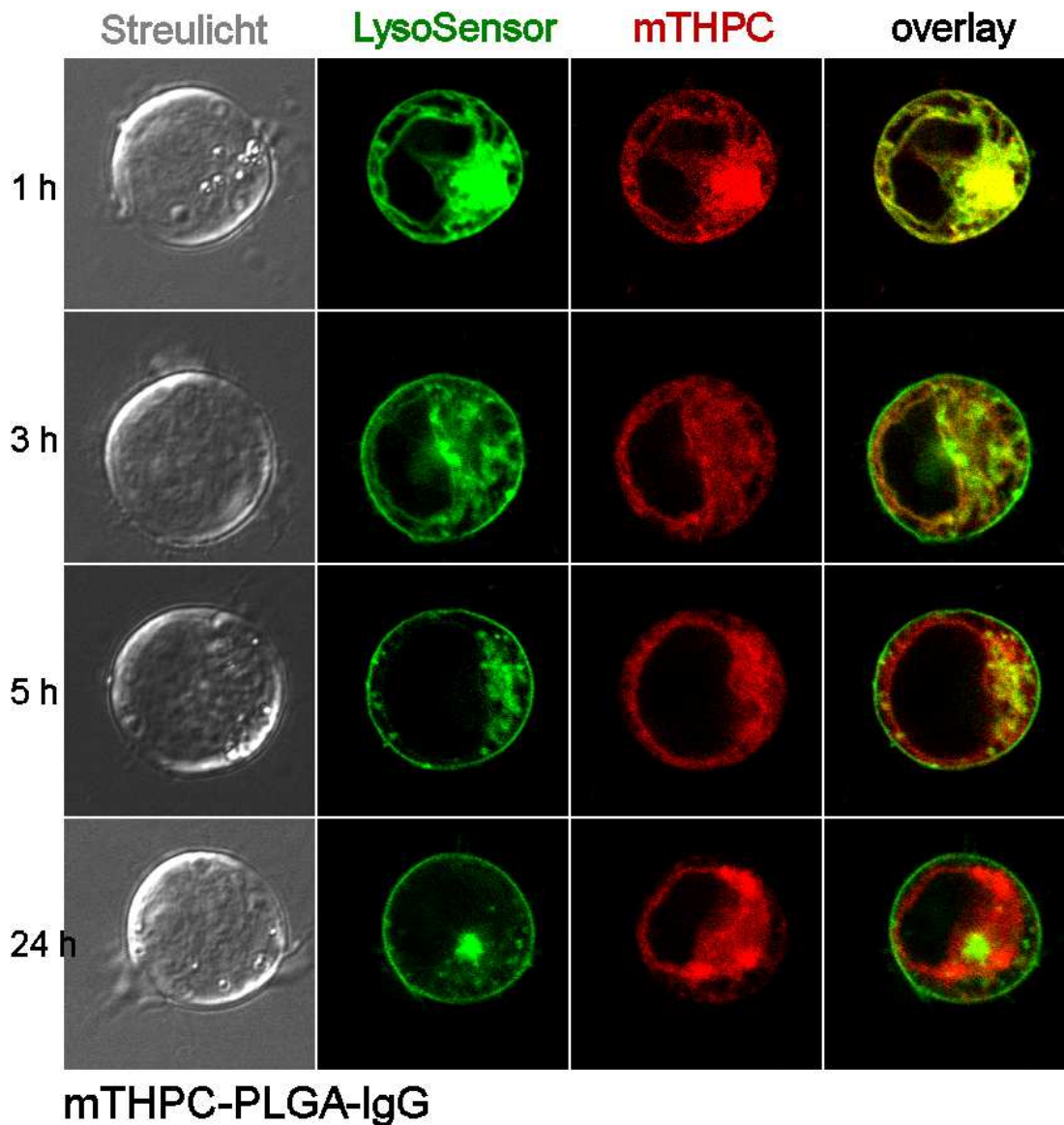


Abbildung 7.12: CLSM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPC-PLGA-IgG. Die Endosomen und Lysosomen der Zellen wurden mit LysoSensor green markiert (grüne Fluoreszenz), die rote Fluoreszenz stammt vom mTHPC. Gelbe Signale im Overlay charakterisieren die Kolokalisation von mTHPC und LysoSensor green. Anregungswellenlänge für beide Farbstoffe: $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$. Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$).

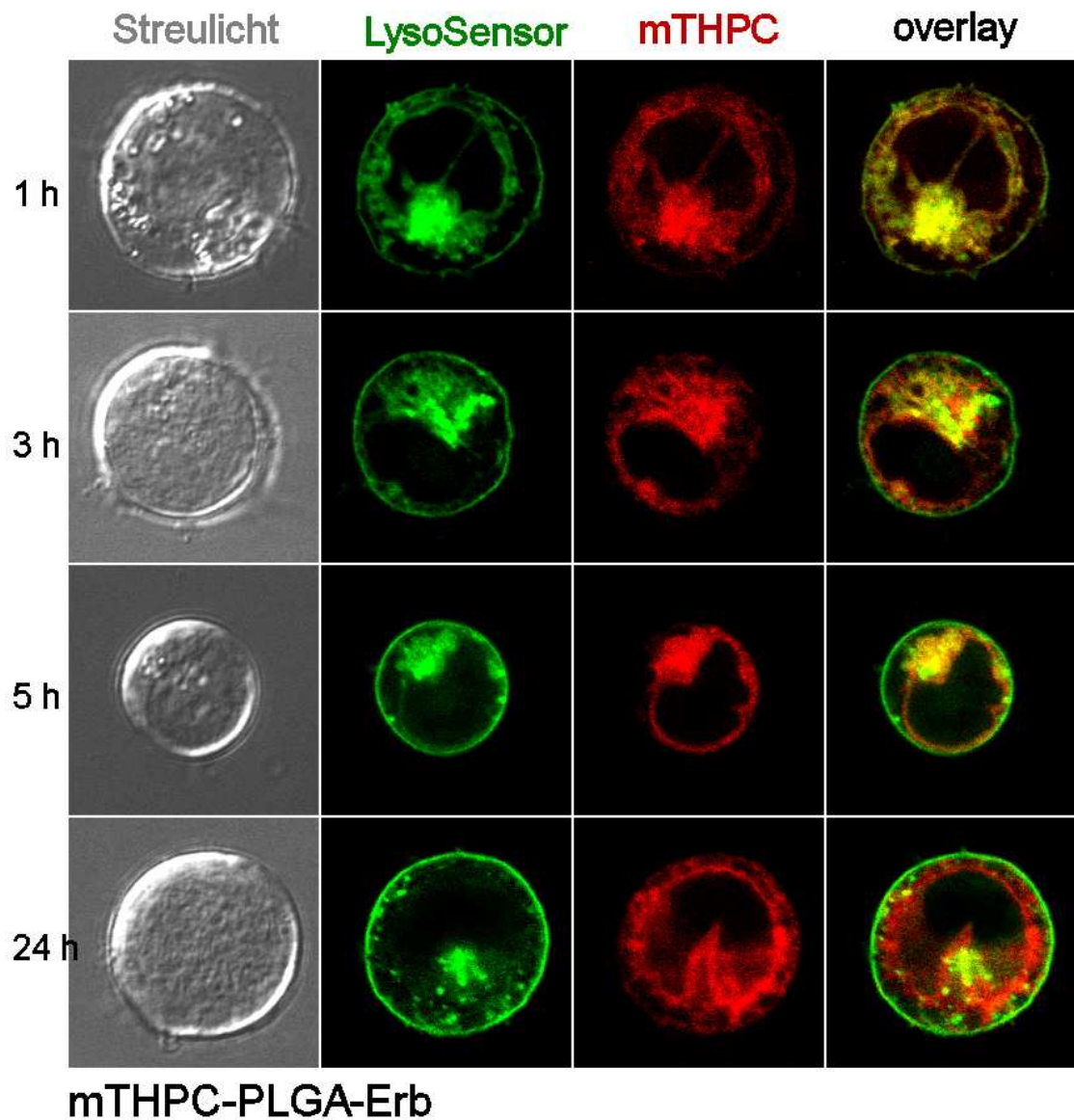


Abbildung 7.13: CLSM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPC-PLGA-Erb. Die Endosomen und Lysosomen der Zellen wurden mit LysoSensor green markiert (grüne Fluoreszenz), die rote Fluoreszenz stammt vom mTHPC. Gelbe Signale im Overlay charakterisieren die Kolo-kalisation von mTHPC und LysoSensor green. Anregungswellenlänge für beide Farbstoffe: $\lambda_{ex} = 405 \text{ nm}$. Für jede Probe wurden je mindestens vier verschiedene Zellen aufgenommen, je ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt ($n=4$).

7.3.6 Lysosomaler Abbau der mTHPC-beladenen PLGA-Nanopartikel und Freisetzung des mTHPC -Nachweis mittels FLIM

Im folgenden Abschnitt werden die FLIM-Untersuchungen an den mit verschiedenen AK modifizierten mTHPC-PLGA-NP im Vergleich zu freiem mTHPC (ohne NP) beschrieben.

Die FLIM-Bilder und die dazu gehörigen Histogramme über die Häufigkeit der in den Bildern gemessenen Fluoreszenzlebensdauern, der mit mTHPC-PLGA, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-Erb inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.14 dargestellt.

Die Ergebnisse der FLIM-Messungen und Histogramme der mit mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen sind Abbildung 6.13 zu finden.

Die Verteilung der gemessenen Fluoreszenzlebensdauern in den mit mTHPC-PLGA, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-Erb inkubierten Jurkatzellen ist der von mit mTHPC (ohne NP) inkubierten Jurkatzellen sehr ähnlich. Zu Beginn der Inkubationszeit liegt die mittlere Fluoreszenzlebensdauer etwa bei 9 ns. Nach 24 h Inkubation verkürzt sich diese mittlere Fluoreszenzlebensdauer auf etwa 6,5 ns bis 7 ns.

Die Verkürzung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer in den mit mTHPC (ohne NP) inkubierten Zellen kann erst nach 24 h Inkubation detektiert werden (siehe Abbildung 6.13). In den mit mTHPC-PLGA, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-Erb inkubierten Jurkatzellen findet bereits nach 5 h Inkubation eine geringe Verkürzung der mittleren Fluoreszenzlebensdauer auf etwa 8,5 ns (mTHPC-PLGA-IgG) beziehungsweise 8,0 ns (mTHPC-PLGA und mTHPC-PLGA-Erb) statt.

In den mit mTHPC-PLGA inkubierten Jurkatzellen ist schon nach 3 h Inkubation eine geringe Verkürzung der mittleren Fluoreszenzlebensdauern auf etwa 8,5 ns zu beobachten.

Diese Unterschiede in der Dynamik der Verschiebung der Fluoreszenzlebensdauern in den mit mTHPC-beladenen PLGA-NP inkubierten Jurkatzellen, zeigen dass die lysosomale Freisetzung des mTHPC von den PLGA-NP in anderer Geschwindigkeit vonstatten geht als die lysosomale Freisetzung des mTHPC welches assoziiert an Albumine im Nährmedium endozytotisch aufgenommen wurde.

Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Stabilität der adsorptiven mTHPC-PLGA-Bindung.

7.3.7 Dunkeltoxizität und Phototoxizität von unterschiedlich modifizierten mTHPC beladenen PLGA-Nanopartikeln

Die Ergebnisse der Dunkeltoxizitätstests an mit mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG, mTHPC-PLGA-PEG im Vergleich zu mit mTHPC (ohne NP) und mTHPC-PLGA^a inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.15 dargestellt.

Die Totzellraten liegen alle unter 3 %. Auch die Totzellraten der nicht inkubierten Zellen (Ref) liegen in diesem Bereich. Es konnten für keine der Proben toxische Effekte an unbestrahlten Zellen festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Phototoxizitätstests an mit mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG, mTHPC-PLGA-PEG im Vergleich zu mit mTHPC (ohne NP) und mTHPC-PLGA^a

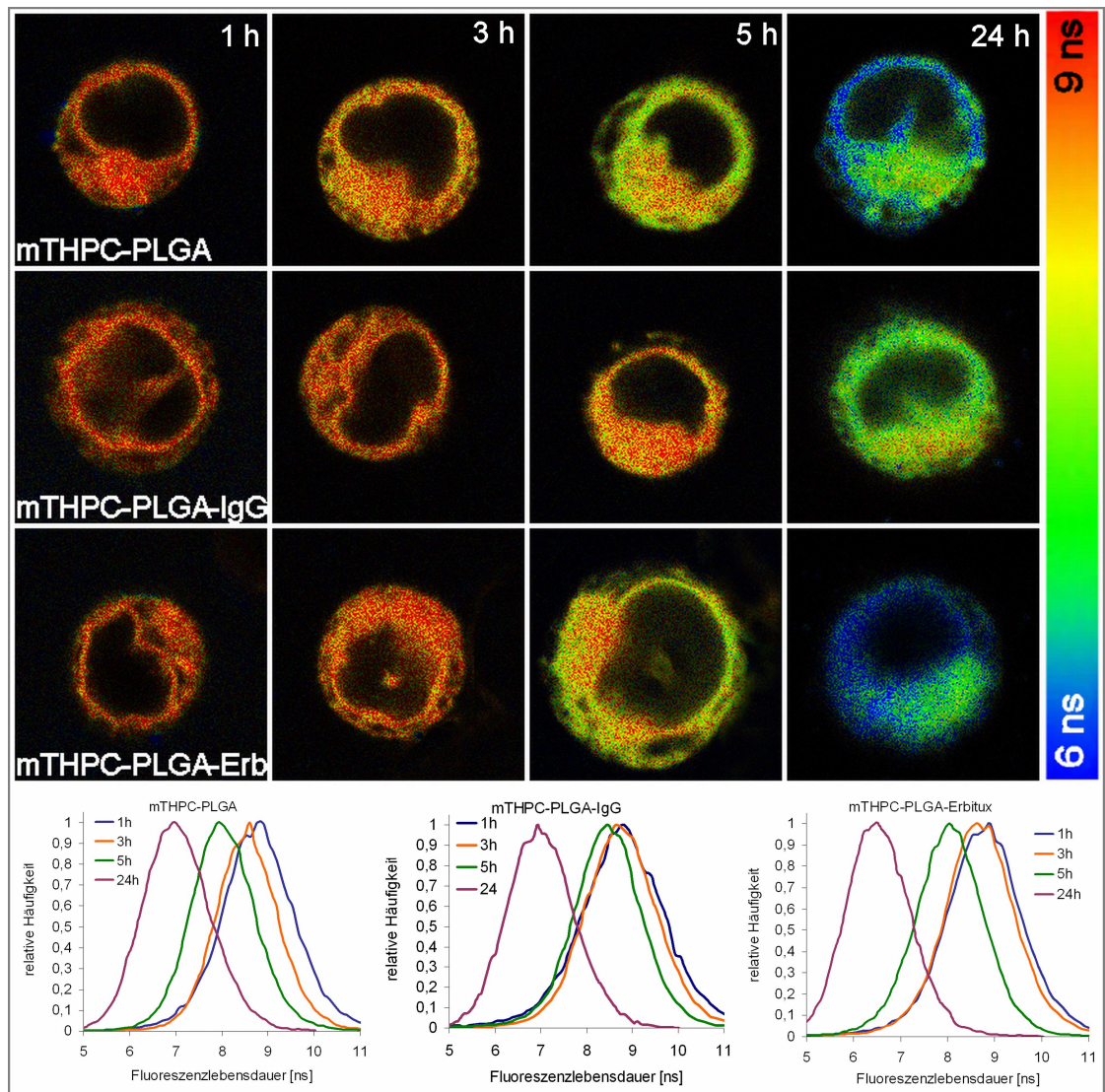


Abbildung 7.14: FLIM-Bilder von Jurkatzellen inkubiert mit mTHPP-PLGA, mTHPP-PLGA-IgG und mTHPP-PLGA-Erb. Fluoreszenzanregung mit einem gepulsten ns-Laser ($\lambda_{ex} = 440 \text{ nm}$). Die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern in jedem Bildpunkt sind farbcodiert dargestellt (siehe Farbskala). Die Histogramme (unten) zeigen die relative Häufigkeit der in je 4 verschiedenen Zellen gemessenen Fluoreszenzlebensdauern.

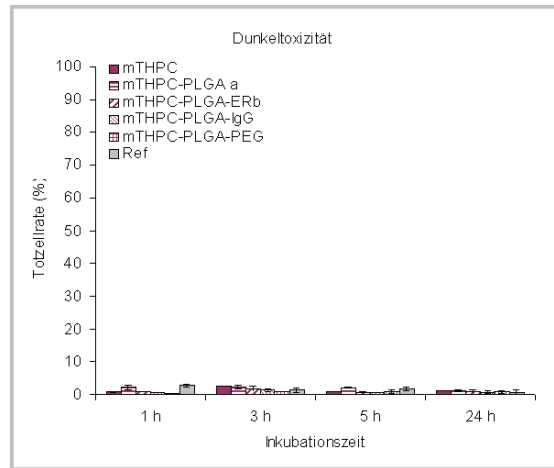


Abbildung 7.15: Dunkeltoxizität von mTHPC, mTHPC-PLGA^a, mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG, mTHPC-PLGA-PEG und unbehandelten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

(ohne Modifizierung) inkubierten Jurkatzellen sind in Abbildung 7.16 dargestellt.

Genau wie mit mTHPC (ohne NP) und mTHPC-PLGA^a (genaue Beschreibung siehe Unterunterabschnitt 4.1.4.2 und Unterabschnitt 7.2.2) wird auch in mit mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG, mTHPC-PLGA-PEG inkubierten und anschließend bestrahlten Jurkatzellen eine sehr hohe Phototoxizität erreicht, jedoch erst nach einer Inkubationszeit von 24 h.

Nach 1 h Inkubation mit den modifizierten mTHPC-PLGA-NP sind die Apoptoseraten noch sehr viel geringer als nach 1 h Inkubation mit mTHPC.

Nach 5 h Inkubation steigt die Apoptoserate von unmodifiziertem mTHPC-PLGA auf das Niveau von freiem mTHPC, die Apoptoserate der modifizierten mTHPC-PLGA-NP bleibt jedoch gleich.

Die von Kuan Chen gemessenen Amplituden des 1O_2 -Signals (I_{Δ}^a) in 5 h mit unmodifizierten und modifizierten mTHPC-PLGA inkubierten Jurkatzellen zeigen, dass in den mit mTHPC ohne NP beziehungsweise mit unmodifizierten mTHPC-PLGA inkubierten Jurkatzellen deutlich mehr 1O_2 generiert wird, als in den mit modifizierten mTHPC-PLGA inkubierten Jurkatzellen (siehe Tabelle 9). Die stärkere 1O_2 -Generierung wird durch die Freisetzung des mTHPC von den NP verursacht und hat die deutlich steigende Phototoxizität in den mit unmodifizierten mTHPC-PLGA inkubierten Jurkatzellen zur Folge.

Nach 24 h Inkubation erreichen alle mit mTHPC beladenen PLGA-NP eine ähnlich hohe Apoptoserate. Die Apoptoserate in den Jurkatzellen der mit mTHPC beladenen PLGA-NP liegt sogar signifikant höher als die von freiem mTHPC.

Die CLSM- und FLIM-Experimente haben gezeigt, dass mittels modifizierter PLGA-NP transportiertes mTHPC während der ersten 5 h Inkubation zum größten Teil in

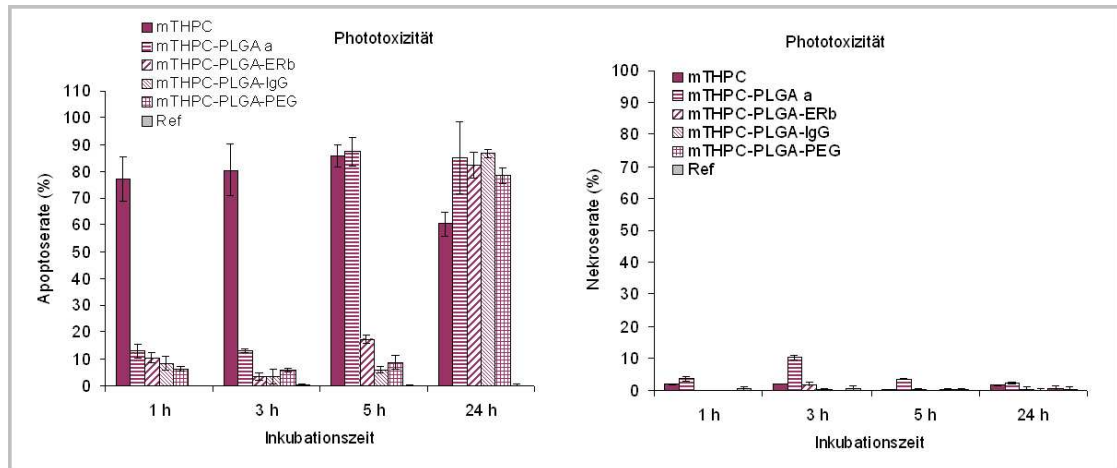


Abbildung 7.16: Phototoxizität von mTHPC, mTHPC-PLGA^a, mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG, mTHPC-PLGA-PEG und nicht photosensibilisierten (Ref) Jurkatzellen. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

den Lysosomen vorliegt (siehe Unterabschnitt 7.3.3 und Unterabschnitt 7.3.6). Eine Freisetzung des mTHPC von den modifizierten PLGA-NP und eine Verteilung im Zytoplasmabereich ist erst nach 24 h Inkubation beobachtet worden.

Nicht nur die intrazelluläre Freisetzung findet erst nach 24 h Inkubation statt. Auch die intrazelluläre mTHPC-Konzentration der mit mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-PEG inkubierten Jurkatzellen steigt erst nach 24 h deutlich an.

Die geringe Phototoxizität der modifizierten mTHPC-PLGA-NP innerhalb der ersten 5 h Inkubation und der extreme Anstieg der Phototoxizität nach 24 h Inkubation werden somit durch eine sehr verlangsamte endozytotosche Aufnahme und die verzögerte Freisetzung verursacht.

Die Modifizierung der PLGA-NP verlangsamt die Aufnahme und die Freisetzung des mTHPC. Letztendlich beeinflusst sie die Effizienz der nach 24 h Inkubation erreichten Phototoxizität jedoch nicht.

7.3.8 Phototoxizität modifizierter mTHPC-PLGA-Nanopartikel in HT29-Zellen -Apoptosenachweis mittels Caspase 3/7-Assay

Die Phototoxizität der AK-modifizierten mTHPC-PLGA-NP wurde auch in HT29-Zellen bestimmt.

Die adhärennten HT29-Zellen können nicht mit der selben Methode auf Phototoxizität untersucht werden, wie die Jurkatzellen. Für dieses Experiment wurde daher ein biochemischer Assay gewählt mit dem die Zellen auf Aktivität der Caspasen 7 und 3 untersucht werden können. Die Aktivität der Caspasen 7 und 3 ist ein Maß für die Apoptose.

Als Positivkontrolle sind mit Staurosporin inkubierte HT29-Zellen gemessen worden.

Anhand der Chemilumineszenz der Positivkontrolle sind alle anderen Messungen normiert worden. Die relativen Caspase 3- und 7-Aktivitäten der mit mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-PEG inkubierten im Vergleich zu mit mTHPC (ohne NP) und mTHPC-PLGA^a inkubierten HT29-Zellen sind in Abbildung 7.17 dargestellt.

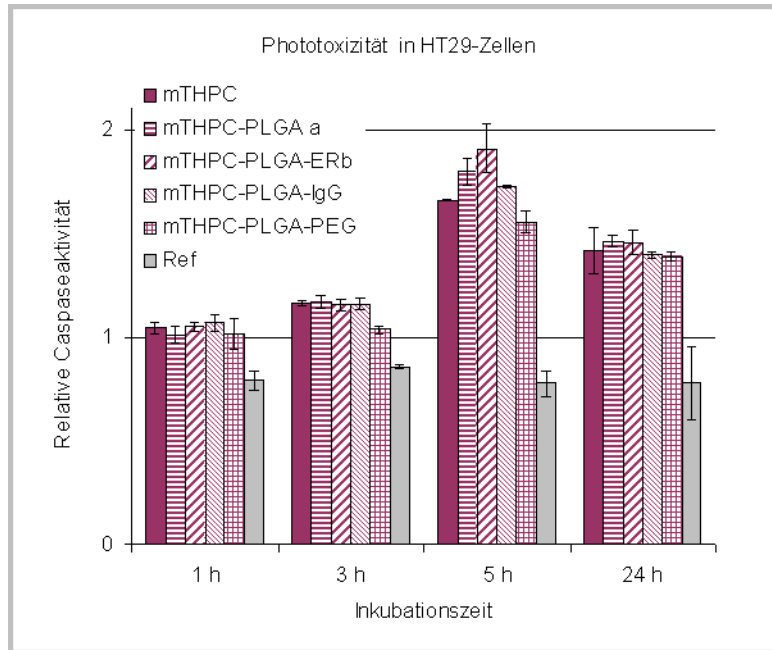


Abbildung 7.17: Phototoxizität von mTHPC, mTHPC-PLGA^a, mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG, mTHPC-PLGA-PEG und nicht photosensibilisierten (Ref) HT29-Zellen. Nachweis mittels Caspase 3/7-Assay. Als Positivkontrolle dienten Staurosporin-inkubierte HT29-Zellen. Die gemessenen Caspaseaktivitäten wurden auf die Staurosporin-Positivkontrolle normiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD aus 6 Messungen (n=6)

Bis auf die Referenz (Ref) zeigen alle Proben eine relative Caspaseaktivität über eins. Das bedeutet, dass in allen Proben eine höhere Caspasen 7- und 3-Konzentration herrscht als in der Apoptosepositivkontrolle. Das Zellgift Staurosporin scheint in HT29-Zellen deutlich schwächer zu wirken als in Jurkatzellen (siehe Unterunterabschnitt 3.3.4.2 Abbildung 3.8). Aus diesem Grund kann keine absolute Apoptoserate berechnet werden.

Nach 1 h und 3 h Inkubation ist in allen Proben eine höhere Caspasen 7- und 3-Aktivität gemessen worden als in der Referenz, mit Werten von knapp über eins ist die relative Caspasen 7- und 3-Aktivität aber noch relativ gering.

Die maximalen relativen Caspase 7- und 3-Aktivitäten sind für alle Proben nach 5 h Inkubation gemessen worden (mTHPC: $1,65 \pm 0,01$, mTHPC-PLGA^a: $1,8 \pm 0,1$, mTHPC-PLGA-Erb: $1,9 \pm 0,2$, mTHPC-PLGA-IgG: $1,72 \pm 0,02$ und mTHPC-PLGA-PEG: $1,55 \pm 0,05$).

Nach 24 h Inkubation sinkt die relative Caspasen 7- und 3-Aktivität für alle Proben

wieder etwas (mTHPC: $1,4 \pm 0,2$, mTHPC-PLGA^a: $1,46 \pm 0,04$, mTHPC-PLGA-Erb: $1,5 \pm 0,1$, mTHPC-PLGA-IgG: $1,39 \pm 0,02$ und mTHPC-PLGA-PEG: $1,39 \pm 0,03$).

Obwohl HT29-Zellen den EGFR überexprimieren, ist kein deutlicher Unterschied zwischen der Phototoxizität von mit mTHPC-PLGA-Erb inkubierten HT29-Zellen zu allen anderen Proben detektierbar.

Obwohl auch in HT29-Zellen die endozytotische Aufnahme der modifizierten PLGA-NP verglichen mit den unmodifizierten PLGA-NP verlangsamt ist (siehe Unterabschnitt 7.3.2 Abbildung 7.10), scheint sich diese Tatsache nicht auf die Phototoxizität auszuwirken. Das Maximum der intrazellulären mTHPC-Konzentration der mit modifizierten PLGA-NP inkubierten HT29-Zellen wird nach 24 h Inkubation erreicht. Trotz der geringen intrazellulären mTHPC-Konzentration nach 5 h Inkubation, ist nach dieser Inkubationszeit die Phototoxizität am höchsten.

Auch dieses Ergebnis zeigt, dass eine besonders hohe intrazelluläre PS-Konzentration keine optimale Phototoxizität garantiert.

7.4 Diskussion der photodynamischen Wirksamkeit photoaktiver PLGA-Nanopartikel

In den voran gegangenen Abschnitten dieses Kapitels wurden die Ergebnisse aller Untersuchungen an PS-beladenen PLGA-NP beschrieben. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten PS-PLGA-NP-Systeme PS in Jurkatzellen transportieren, diese dort anreichern und mittels Bestrahlung Zelltodmechanismen auslösen können.

Die hier dargestellten Ergebnisse belegen damit das Potential von PLGA-NP als Transportsysteme für Wirkstoffe der PDT.

Die Effizienz der photodynamischen Wirkung der verschiedenen untersuchten mit mTHPP und mTHPC beladenen PLGA-NP unterscheidet sich stark.

Die Eigenschaften der PS-PLGA-NP-Systeme, welche die Effizienz der Photosensibilisierung und die Eignung der Systeme als Wirkstoff-Transportsysteme beeinflussen, sind denen von HSA-NP sehr ähnlich.

Dieser Arbeit voran gegangene photophysikalische Untersuchungen an den verschiedenen mit PS beladenen PLGA-NP zeigen, dass die PS Moleküle auf und in den NP stark mit einander wechselwirken, was die Fähigkeit zur 1O_2 -Generierung deutlich reduziert (siehe Abschnitt 2, Tabellen 7, 8 und 9). Deshalb können erst die durch intrazelluläre Freisetzung monomerisierten PS-Moleküle effizient 1O_2 generieren. Dies spiegelt sich deutlich in den nach 1 h geringen, und mit fortschreitender Inkubationszeit ansteigenden Phototoxizitäten der verschiedenen mit PS beladenen HSA-NP wider.

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Verwendung als Transportsysteme ist die Stabilität der adsorptiven PS-HSA Verbindung unter biologisch relevanten Bedingungen.

Besonderen Einfluss auf die Effizienz der Photosensibilisierung haben auch bei den PLGA-NP die Wahl des PS und die adsorptive oder inkorporative Verbindung des PS mit den NP. Das Ergebnis sind NP mit auf der Oberfläche adsorbierten oder im Inneren des NP inkorporierten PS.

Wie bereits im Kapitel für die HSA-NP diskutiert (siehe Kapitel 6 und Abschnitt 6.2) kann auch die Beladungsrate der PLGA-NP oder deren Oberflächenmodifizierung die Effizienz der Photosensibilisierung und die Eignung der Systeme als Wirkstoff-Transportsysteme beeinflussen.

Diese Materialeinflüsse und die relevanten zellulären Prozesse sollen in den folgenden Abschnitten näher betrachtet werden. Eine Aufzählung und Erläuterung der relevanten zellulären Prozesse ist bereits im Rahmen der Diskussion über HSA-NP in Kapitel 6.2 zu finden.

7.4.1 Einfluss von mTHPP und mTHPC auf die photodynamische Wirksamkeit von PLGA-Nanopartikeln

Die Einflüsse der beiden verschiedenen PS mTHPC und mTHPP auf die Effizienz der Photosensibilisierung nach Inkubation von Jurkatzellen mit PLGA-NP sind den beobachteten Effekten bei HSA-NP sehr ähnlich (siehe Abschnitt 6.2.1).

mTHPP

Die Wirkungseffizienz von freiem mTHPP (ohne NP) wird in Kapitel 6.2.1 diskutiert.

Wie schon bei der Untersuchung von mTHPP-beladenen HSA-NP beobachtet werden konnte, ist die Phototoxizität von mit mTHPP beladenen PLGA-NP geringer als die Phototoxizität von freiem mTHPP. Damit ist die Effizienz der Photosensibilisierung von Jurkatzellen durch mTHPP beladene PLGA-NP für einen Wirkstofftransportsysteme in der PDT nicht ausreichend.

Die Experimente mit mTHPP beladenen PLGA NP an Jurkatzellen weisen darauf hin, dass mTHPP inhibitorisch auf diverse aktive zelluläre Prozesse wirkt. Es konnte auch beobachtet werden, dass die Endozytosegeschwindigkeit und der lysosomale Abbau der mTHPP-beladenen PLGA-NP verlangsamt sind. Auch auf das Zellwachstum hat die Anwesenheit von mTHPP im Nährmedium einen verlangsamenenden Effekt.

PS sollten ausser der phototoxischen Wirkung keinen Einfluss auf biologische Strukturen und Prozesse haben, da diese in der klinischen Anwendung zu nicht kontrollierbaren, unerwünschten Nebenwirkungen führen können.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an mTHPP-beladenen PLGA-NP zeigen, dass mTHPP nicht geeignet ist für die Verwendung als PS in Verbindung mit PLGA-NP als Transportsysteme für die PDT.

mTHPC

Die Wirkungseffizienz von freiem mTHPC (ohne NP) wird in Kapitel 6.2.1 diskutiert.

Auch mittels PLGA-NP lässt sich mTHPC sehr effizient in Jurkatzellen anreichern.

Der Transport des mTHPC mittels PLGA-NP in die Jurkatzellen findet endozytotisch statt. Bereits nach 5 h Inkubation ist durch den lysosomalen Abbau der PLGA-NP genug mTHPC ins Zytoplasma freigesetzt um maximale Phototoxizität auszulösen.

Mit PLGA-NP wird die höchste Phototoxizität durch mTHPC-Beladung erreicht. Ähnlich wie bei HSA-NP ist die Apoptoserate der mit mTHPC-beladenen PLGA-NP inkubierten Jurkatzellen nach kürzeren Inkubationszeiten (1 h, 3 h) deutlich geringer, als die der mit freiem mTHPC inkubierten Jurkatzellen. Nach 5 h Inkubation wird auch mit mTHPC-beladenen PLGA-NP die höchste Apoptoserate in Jurkatzellen erreicht. Die starke Phototoxizität der mit mTHPC-beladenen PLGA-NP fällt im Gegensatz zum freien mTHPC (ohne NP) nach 24 h nicht ab.

Der über einen Zeitraum von einigen Stunden stattfindende Freisetzungsprozess der PLGA-NP ermöglicht eine zeitlich dosierte Verteilung im Zytoplasma. Diese Dynamik bewirkt, dass auch nach 24 h Inkubation noch genug mTHPC-Moleküle so im Zytoplasma lokalisiert sind, dass eine maximale Wirkung möglich ist. Dieser Effekt unterscheidet sich nicht von dem mit mTHPC-beladenen HSA-NP erreichten Effekt.

Betrachtet man nur die erreichbaren Apoptoseraten, unterscheiden sich die mit mTHPC-beladenen PLGA-NP kaum von den mit mTHPC-beladenen HSA-NP.

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten mit PS-beladenen NP-Proben wurden mit den mit mTHPC-beladenen PLGA-NP jedoch auch signifikant erhöhte Nekroseraten (bis zu 16 %) in Jurkatzellen gemessen.

Dieser Unterschied in der phototoxischen Wirkungsweise könnte von großem Vorteil sein. Als Hauptzelltodmechanismus nach der photodynamischen Behandlung wird die Apoptose angesehen, da sie bei Behandlung von Patienten eine geringe Belastung des Immunsystems zur Folge hat. Ein geringer Anteil an Nekrose, und damit eine geringe Stimulierung des Immunsystems zur Bekämpfung der Krebszellen könnte das Überleben einzelner Krebszellen verhindern und damit das Rückfallrisiko nach der Behandlung minimieren.

Die Frage nach der Stabilität der mTHPC-beladenen PLGA-NP, unter biologisch relevanten Bedingungen, ist genau wie bei mTHPC-beladenen HSA-NP mit den durchgeführten *in vitro* Experimenten nicht eindeutig zu klären. Die beobachteten Unterschiede in der Entwicklung der Phototoxizität, des lysosomalen Abbaus und der intrazellulären Freisetzung über die gesamte Inkubationszeit sind gute Hinweise auf die Stabilität der adsorptiven mTHPC-PLGA-Bindung. Hier ist ebenfalls eine genauere Prüfung nötig.

7.4.2 Einfluss der Beladungsrate und der Beladungsstrategie auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver PLGA-Nanopartikel

Zur Untersuchung des Einflusses der PS-Beladungsstrategie wurden drei verschiedene mTHPC-beladene PLGA-NP untersucht: mTHPC-PLGA^{ia} (mTHPC inkorporiert und auf der Oberfläche adsorbiert), mTHPC-PLGAⁱ (mTHPC inkorporiert), mTHPC-PLGA^a (mTHPC auf der Oberfläche adsorbiert).

Die Probe mTHPC-PLGA^{ia} unterscheidet sich von den anderen beiden nicht nur durch die Kombination beider Beladungsstrategien, sondern auch durch ihre Beladungsrate, dadurch konnte mit diesen Proben ebenfalls die Auswirkung der Beladungsrate untersucht werden.

Die höhere mTHPC-Beladung der PLGA-NP führt zu einer schnelleren Anreicherung von mTHPC in Jurkatzellen. Die erreichte intrazelluläre mTHPC-Konzentration nach kurzen Inkubationszeiten (1 h bis 5 h) ist deutlich höher als die von mit mTHPC-PLGAⁱ und mTHPC-PLGA^a inkubierten Jurkatzellen. Jedoch unterscheiden sich die intrazellulären mTHPC-Konzentrationen nach 24 h Inkubation mit den drei Proben nicht mehr signifikant. Da bereits sehr geringe intrazelluläre mTHPC-Konzentrationen in der Lage sind eine hohe Phototoxizität auszulösen, ist diese stärkere Anreicherung jedoch irrelevant.

Neben der schnelleren Anreicherung führt die höhere Beladung jedoch auch zu einer schnelleren Freisetzung der ersten mTHPC-Moleküle. Da bereits eine geringe Menge intrazellulär freigesetztes mTHPC für eine effektive Photosensibilisierung ausreicht, führt dieser durch die hohe Beladung verursachte Effekt zu maximaler Phototoxizität nach sehr kurzer Inkubationszeit (3 h).

Da bei einer klinischen Verwendung der mTHPC-beladenen PLGA-NP als Wirkstoff-transportsysteme mit einberechnet werden muss, dass vor der intrazellulären Aufnahme erst die Anreicherung der NP aus dem Blutstrom ins Zielgewebe stattfinden muss, ist eine sehr schnelle Freisetzung der Wirkstoffe nur bedingt nützlich.

Ähnlich wie schon bei den HSA-NP beobachtet werden konnte, ist daher eine höhere Beladung der PLGA-NP mit mTHPC nicht nötig, weil auch mit der geringen Beladung

nach 5 h Inkubation maximale Phototoxizität erreicht wird.

Sowohl die Inkorporation von mTHPC in die PLGA-NP als auch die adsorptive Beladung der Oberfläche der PLGA-NP führen zu Transportsystemen die sehr effizient mTHPC in Jurkatzellen anreichern und es in den Zellen freisetzen, was zu einer hohen Phototoxizität führt. Betrachtet man also die Effizienz der Photosensibilisierung, spielt die Beladungsstrategie keine Rolle.

Die Strategie der Inkorporation hat jedoch trotzdem einen Vorteil im Vergleich zur Strategie der adsorptiven Beladung der Oberfläche. Die inkorporierten PS-Moleküle können vor der Freisetzung nicht mit zellulären Bestandteilen wechselwirken, da sie durch die PLGA-Polymere abgeschirmt werden. Für die adsorptiv mit mTHPC beladenen PLGA-NP konnten keine negativen Einflüsse des mTHPC auf zelluläre Prozesse beobachtet werden, das schließt aber die Möglichkeit solcher Einflüsse *in vivo* nicht aus. Daher ist unabhängig vom letztendlich verwendeten PS die Strategie der Inkorporation der PS in die PLGA-NP zu bevorzugen.

7.4.3 Einfluss der Antikörper-Modifizierung und der PEGulierung auf die photodynamische Wirksamkeit photoaktiver PLGA-Nanopartikel

Das Targeting von Tumorgewebe mittels NP funktioniert auf passiver Basis über den EPR-Effekt. Durch die Modifizierung der PLGA-NP mit AK soll zusätzlich aktives Targeting über AK-Rezeptor-Wechselwirkungen ermöglicht werden.

Die im Rahmen des Verbundprojektes NanoCancer durchgeführten *in vitro* Experimente an PEGulierten, mit Erbitux oder IgG modifizierten mit mTHPC-beladenen PLGA-NP zeigen, dass die NP endozytotisch von Jurkatzellen und HT29-Zellen aufgenommen werden und in der Lage sind mTHPC in den Zellen anzureichern.

Die mit den modifizierten PLGA-NP erreichbaren intrazellulären mTHPC-Konzentrationen sind jedoch deutlich geringer als die mit nicht modifizierten PLGA-NP.

Trotz der geringeren intrazellulären mTHPC-Konzentration wird nach 24 h Inkubation maximale Phototoxizität erreicht. Nach kurzen Inkubationszeiten ist die Phototoxizität der modifizierten PLGA-NP jedoch deutlich geringer als die der nicht modifizierten mTHPC-beladenen PLGA-NP.

Die Modifizierung verlangsamt die Aufnahme der PLGA-NP und deren lysosomalen Abbau und damit auch die intrazelluläre Freisetzung des mTHPC. Dadurch schränkt die Modifizierung die Funktionalität der PLGA-NP als Wirkstofftransportsysteme deutlich ein.

Die Experimente an HT29-Zellen wurden aufgrund deren Überexprimierung des EGFR durchgeführt. Würde die Modifizierung einen positiven Effekt auf die Aufnahme der Partikel haben, hätten die Erbitux-modifizierten PLGA-Partikel deutlich besser aufgenommen werden müssen als die IgG-modifizierten oder die unmodifizierten. Dies ist aber nicht der Fall. Unmodifizierte PLGA-NP werden bereits in so hohem Maße von den HT29-Zellen (und auch von den Jurkatzellen) endozytiert, dass eine Steigerung kaum mehr möglich ist. Daher erschwert die Modifizierung, trotz der vorhandenen Rezeptoren auf der HT29-Zelloberfläche, nur die endozytotische Aufnahme.

Vor diesem Hintergrund und in Anbetracht der Tatsache dass der EPR-Effekt bereits ein

sehr selektives Targeting von Tumorgewebe ermöglicht, ist die zusätzliche Modifizierung der PLGA-NP fragwürdig.

7.4.4 Stabilität der photoaktiven PLGA-Nanopartikel

Die CLSM-Experimente an mTHPP-beladenen PLGA-NP weisen deutlich auf deren Stabilität hin. Es konnte gezeigt werden, dass mittels PLGA-NP mTHPP-endozytotisch in die Jurkatzellen aufgenommen wird, wogegen das freie mTHPP (ohne NP) direkt durch die Zytoplasmamembran ins Zytoplasma gelangt.

Schwieriger ist diese Aussage für mTHPC-beladene PLGA-NP zu treffen, da auch freies mTHPC, adsorbiert an Albumine im Nährmedium, endozytotisch aufgenommen wird. Unterschiede in der Dynamik der Aufnahme des lysosomalen Abbaus, der intrazellulären mTHPC-Freisetzung und der Phototoxizität lassen vermuten, dass auch diese Partikel stabil sind. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen, die schon mit den HSA-NP gemacht wurden.

Daher ist für beide, PLGA- und HSA-NP, eine genauere Prüfung auf Stabilität nötig bevor die PS-beladenen NP in einer nächsten Untersuchungsphase *in vivo* getestet werden können.

Eine genauere Diskussion zur Stabilität der NP ist in Kapitel 6.2.4 zu finden.

8 Diskussion - Photosensibilisator-beladene HSA- und PLGA- Nanopartikel als Transportsysteme in der Photodynamischen Therapie

8.1 Tabellarische Zusammenfassung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen an den verschiedenen mit PS beladenen HSA- und PLGA-NP kurz tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 8.1 und 8.2). Diese Zusammenfassung soll als Übersicht für die folgende Diskussion dienen.

8.2 Intrazelluläre Photosensibilisatorkonzentration - Viel hilft viel?

Ein Schwerpunkt in der Entwicklung neuer Wirkstofftransportsysteme liegt in der Optimierung der Wirkstoffbeladungsrate. Es wird versucht, möglichst viele Wirkstoffmoleküle an eine Transporteinheit zu binden, um eine höchstmögliche Anreicherung von Wirkstoffen im Zielgewebe zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine maximale Beladung biodegradierbarer NP mit PS keinen Vorteil bringt und die höchste Dosis PS in den Zellen nicht zur effektivsten Photosensibilisierung führt.

Die Bestimmung der intrazellulären Konzentration von mit mTHPC-PLGA^{ia} (32 µg/mg) und mTHPC-PLGA^a (18 µg/mg) inkubierten Jurkatzellen zeigt, dass die höhere Beladung zu keiner signifikant stärkeren intrazellulären Anreicherung führt (siehe Abschnitt 7.2).

mTHPC ist von den drei hier verwendeten PS der effektivste. Die Quantifizierung der intrazellulären Aufnahme und die Bestimmung der Phototoxizität von mTHPC ohne NP (siehe Abschnitt 7.2) zeigen, dass bereits sehr geringe Mengen an frei in der Zelle vorliegenden PS-Molekülen maximal phototoxisch wirken können. Bei Erreichen der maximalen intrazellulären mTHPC-Konzentration ist die Phototoxizität zwar immer noch sehr hoch, jedoch bereits signifikant niedriger als mit geringeren intrazellulären mTHPC-Konzentrationen.

Es ist offensichtlich möglich, die Zellen mit PS zu „überladen“. Die gemessenen intrazellulären PS-Konzentrationen sind ein Mittelwert über das ganze Zellvolumen. Da die PS-Moleküle jedoch nicht homogen über das komplette Zellvolumen verteilt sind, müssen die lokalen PS-Konzentrationen noch deutlich höher sein. Eine lokal sehr starke

Akkumulation kann zu Wechselwirkungen zwischen den PS-Molekülen führen, wodurch die 1O_2 -Quantenausbeute verringert wird, in Folge dessen sinkt auch die Phototoxizität.

Besonders interessant sind die Ergebnisse der Phototoxizität in Jurkatzellen die 1 h mit mTHPC, mTHPC-PLGA^a, mTHPC-PLGAⁱ oder mTHPC-PLGA^{ia} inkubiert wurden (siehe Unterabschnitt 7.2.2 Abbildung 7.8). Obwohl die intrazelluläre Konzentration für mTHPC am geringsten ist, aber auch die intrazelluläre Konzentration von den mit den mTHPC-PLGA-NP inkubierten Jurkatzellen nicht in einem kritisch hohen Bereich liegt, ist die Phototoxizität für mTHPC (ohne NP) extrem hoch, für die mTHPC-PLGA-NP jedoch noch relativ gering.

Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht die Anzahl der PS-Moleküle in der Zelle, sondern deren intrazelluläre Lokalisation die Effizienz der Photosensibilisierung entscheidend beeinflusst. Die hohe Phototoxizität der mTHPC-PLGA-NP nach längeren Inkubationszeiten kann daher nicht durch die steigende intrazelluläre mTHPC-Konzentration, sondern durch die langsame Freisetzung der mTHPC-Moleküle von den PLGA-NP verursacht werden.

8.3 Targeting von Gewebetumoren - sind Antikörper nötig?

Die Effizienz von passivem Targeting von Gewebetumoren durch den EPR-Effekt ist bereits bekannt [124–127].

Aufgrund ihrer Größe sind die hier untersuchten PLGA- und HSA- NP gut geeignet dieses Prinzip des passiven Targeting auszunutzen.

Durch die Modifizierung der NP mit PEG und AK sollte getestet werden, ob es Vorteile bringt, die Prinzipien des passiven und des aktiven Targetings zu kombinieren.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass nicht modifizierte NP bereits so effizient von Jurkatzellen und HT29-Zellen endozytiert werden, dass es nicht möglich ist, diesen Prozess durch die Verwendung zellspezifischer AK zu beschleunigen. Teilweise konnte sogar eine Verlangsamung der endozytotischen Aufnahme und des Abbaus der mit AK modifizierten NP beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnten keine Vorteile der AK-Modifizierung der NP beobachtet werden (siehe Abschnitt 7.3).

Die AK-Modifizierung erscheint in Anbetracht der hervorragenden Eigenschaften der unmodifizierten NP und der guten Spezifität des passiven Targetings über den EPR-Effekt unnötig, aufwändig und teuer zu sein.

8.4 Intrazelluläre Freisetzung der Photosensibilisatoren

Photosensibilisatoren müssen als Monomere vorliegen um effizient 1O_2 generieren zu können. Diese Eigenschaft wird durch die Verwendung von biodegradierbaren Wirkstoff-transportern ausgenutzt.

Die photophysikalischen Untersuchungen an den mit PS beladenen PLGA- und HSA-NP von Kuan Chen (siehe Abschnitt 2) und die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente zeigen, dass die kompletten PS-NP-Systeme kaum

$^1\text{O}_2$ generieren. Daraus ergibt sich die geringe Phototoxizität in nur 1 h bis 3 h mit PS-NP-Systemen inkubierten Jurkatzellen (siehe Abschnitte 5.4 und 7.3.7).

Diese Eigenschaft der PS-NP-Systeme kann in der späteren klinischen Anwendung Nebenwirkungen verhindern, welche durch Lichteinwirkung auf den Patienten entstehen, bevor die PS-NP-Systeme das Zielgewebe erreicht haben.

Von den Zielzellen werden sowohl PLGA- als auch HSA- NP endozytotisch aufgenommen. Die Biodegradierbarkeit ermöglicht den Abbau der NP und damit die monomere Verteilung der PS im Bereich des Zytoplasmas (siehe Abschnitte 5.2, 5.2.1, 6.1.4, 7.3.3). Dadurch kann eine maximale Wirksamkeit der PS in den Zielzellen erreicht werden (siehe Abschnitte 5.4 und 7.3.7).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass biodegradierbare NP als Wirkstofftransporter für Photosensibilisatoren geeignet sind. Sie können sowohl einen Transport der Photosensibilisatoren im inaktiven Zustand als auch die Freisetzung und damit die Aktivierung der Wirkstoffe in der Zielzelle ermöglichen.

Die vorliegenden Untersuchungen können dazu beitragen Nebenwirkungen in der klinischen Anwendung der PDT in Zukunft deutlich zu reduzieren. Die für PDT-Patienten große psychische Belastung durch lange Behandlung im Dunkeln könnte durch die Anwendung von biodegradierbaren Wirkstofftransportern deutlich reduziert werden. Das passive Targeting von tumorösem Gewebe mittels nanopartikulärer Wirkstofftransporter kann eine Erweiterung des Spektrums bisheriger PDT-Anwendungen ermöglichen.

8.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte das Potential von HSA- und PLGA-NP als Wirkstofftransporter für PS in der Therapie von Tumoren gezeigt werden. Besonders für die Verwendung mit dem bereits klinisch angewandten PS mTHPC sind die biodegradierbaren NP gut geeignet.

Die hier durchgeführten Versuche sind ausschließlich *in vitro* Experimente. Sie bilden eine wichtige Grundlage zur Untersuchung der Wirkstofftransporter, sie sind aber noch nicht hinreichend für die klinische Verwendung.

Um die HSA- und PLGA-NP als Wirkstofftransporter in der Tumorthherapie anwenden zu können, müssen sie *in vivo* an einem geeigneten Tiermodell und klinisch an Patienten getestet werden.

Bevor *in vivo* Experimente mit den mit mTHPC beladenen HSA- und PLGA-NP durchgeführt werden können, muss jedoch noch die Frage nach der Stabilität der NP-PS-Verbindung eindeutig geklärt werden.

Sollte sich die adsorptive Bindung der PS an die NP als nicht ausreichend stabil erweisen, müssen Strategien zur kovalenten Bindung entwickelt werden. Erste Versuche mit kovalent an HSA-NP gebundenem Pheo wurden abgebrochen, weil diese NP keine Phototoxizität zeigten [161]. Die kovalente Bindung verhinderte die Freisetzung des Pheo innerhalb der Zellen.

Ein zukünftiges Forschungsprojekt in der Arbeitsgruppe Photobiophysik beschäftigt sich mit der lichtgetriggerten Freisetzung von kovalent an Transportsysteme gebundenen

PS-Molekülen. Die Idee hinter diesem Projekt ist, die kovalente Kopplung von PS-Molekülen an Transportsysteme kontrolliert, durch den von den PS-Molekülen selbst generierten 1O_2 , zu lösen. Somit soll zum Zeitpunkt der Bestrahlung gleichzeitig die intrazelluläre Freisetzung der PS-Moleküle und die Photodynamische Therapie starten.

Diese Strategie könnte eine stabile kovalente Bindung von mTHPC an HSA- oder PLGA-NP ohne die Gefahr einer frühzeitigen Freisetzung des mTHPC beispielsweise in den Blutstrom ermöglichen.

PS-HSA-NP	Intrazelluläre Aufnahme	Intrazelluläre PS-Freisetzung	Phototoxizität
Pheo-beladene HSA-NP	gering, (bis 0,4 mM), Endozytose	Freisetzung nach 3 h (PHSA40) bis 5 h (PHSA100) Inkubation	mäßig bis stark , stärkere Phototoxizität bei geringerer GB-Quervernetzung, keine signifikante Nekroserate, Maxima nach 24 h erreicht
mTHPP-beladene HSA-NP	gering, (bis 0,4 mM), Endozytose	Freisetzung sehr langsam (≥ 24 h)	gering, Apoptoserate bis 10 %, keine signifikante Nekroserate, Maximum nach 24 h erreicht
mTHPC-beladene HSA-NP	hoch, ($>1,2$ mM), Endozytose	Freisetzung nach 1 h bis 5 h Inkubation, stärkere Quervernetzung führt zu langsamerer Freisetzung, AK-Modifizierung führt zu langsamerer Freisetzung	hoch, Apoptoserate bis 90 %, keine signifikante Nekroserate, Maximum nach 3 h erreicht

Tabelle 8.1: Übersicht über die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen an den Photosensibilisator-beladenen HSA-Nanopartikeln

PS-PLGA-NP	Intrazelluläre Aufnahme	Intrazelluläre PS-Freisetzung	Phototoxizität
mTHPP-beladene PLGA-NP	hoch, (bis 1 mM), Endozytose	Freisetzung nach 5 h bis 24 h	gering, Apoptoserate bis 25 %, keine signifikante Nekroserate, Maximum nach 24 h erreicht
mTHPC-beladene PLGA-NP	hoch, (>0,8 mM), modifizierte NP geringer (<0,6 mM), Endozytose	Freisetzung nach 1 h bis 5 h Inkubation, stärkere Beladung führt zu langsamerer Freisetzung, AK-Modifizierung führt zu langsamerer Freisetzung	hoch, Apoptoserate bis 90 %, geringe aber signifikante Nekroserate (bis >10 %), Maximum nach 3 h erreicht

Tabelle 8.2: Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchungen an den Photosensibilisator-beladenen PLGA-Nanopartikeln

Anhang

1 Photophysikalische Charakterisierung der photoaktiven HSA-Nanopartikel

In diesem Abschnitt sind photophysikalische Parameter der verschiedenen mit PS beladenen HSA- und PLGA-NP tabellarisch dargestellt. Die Messungen wurden von Kuan Chen im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt [36].

Formelzeichen	Erklärung
$\tau_{1,2,3,\dots}$	Fluoreszenzlebensdauer
τ_T^{air}	Triplettlebensdauer unter Luftsättigung
$\tau_T^{N_2}$	Triplettlebensdauer nach Begasung mit N_2 zur O_2 -Eliminierung
τ_Δ	1O_2 -Lumineszenzlebensdauer
Φ_Δ	1O_2 -Quantenausbeute
$f_{ET} = \frac{\tau_T^{N_2} - \tau_T^{air}}{\tau_T^{N_2}}$	Transfereffizienzfaktor
I_Δ^a	relative Amplitudenhöhe des 1O_2 -Signals

Tabelle 3: Erklärung der photophysikalischen Parameter

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse photophysikalischer Untersuchungen an Pheo und mit Pheo beladenen HSA-NP dargestellt.

Für Pheo in EtOH wurde eine charakteristische Fluoreszenzlebensdauer gemessen. Im Gegensatz dazu wurden für die mit Pheo beladenen HSA-NP jeweils 3 charakteristische Fluoreszenzlebensdauern ermittelt. Das Auftreten mehrerer Fluoreszenzlebensdauern wird durch Wechselwirkungen der PS-Moleküle untereinander und mit dem NP verursacht.

Diese Wechselwirkungen bewirken, dass von den Pheo-Molekülen auf den NP deutlich weniger 1O_2 generiert werden kann als durch das monomere Pheo. Dies spiegelt sich vor allem in den im Vergleich zu monomerem Pheo deutlich erhöhten Triplettlebensdauern unter Luftsättigung (τ_T^{air}) wider. Die im Vergleich zu an HSA-NP gebundenem Pheo deutlich höhere 1O_2 -Quantenausbeute (Φ_Δ) von monomerem Pheo bestätigt das.

Die *in vitro* Messungen (Tabelle 4 Zeilen C und D) zeigen, dass alle Proben auch in Jurkatzellen in der Lage sind 1O_2 zu generieren. Die Triplettlebensdauern unter Luftsättigung nach 24 h Inkubation sind kürzer als nach 5 h Inkubation. Das bedeutet dass die Fähigkeit der Pheo-Moleküle mit Sauerstoff zu wechselwirken mit der Inkubationszeit steigt. Dies weist bereits auf einen Abbau der NP innerhalb der Zellen und auf die damit verbundene Freisetzung der Pheo-Moleküle hin.

Die relative Amplitudenhöhe des 1O_2 -Signals (I_{Δ}^a) nach 5 h Inkubation zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt in den Jurkatzellen, welche mit freiem Pheo inkubiert wurden, deutlich mehr 1O_2 generiert wurde als in Jurkatzellen die mit PHSA40 oder PHSA100 inkubiert wurden.

Am geringsten ist dieses Signal in den mit PHSA100 inkubierten Jurkatzellen. Diese Daten zeigen, dass nach 5 h Inkubation der Abbauprozess der NP bereits im Gange ist, aber noch nicht abgeschlossen. Der Abbau der PHSA40-NP ist bereits weiter fortgeschritten als der der PHSA100-NP. Erst nach dem kompletten Abbau der NP und der damit verbundenen Freisetzung des Pheo kann die maximale Fähigkeit zur 1O_2 -Generierung erreicht werden.

		Pheo	PHSA40	PHSA100
A	$\tau_1[ns]$	$5,7 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,2$
	$\tau_2[ns]$	-	$1,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$
	$\tau_3[ns]$	-	$0,21 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,05$
	χ^2	1,02	1,02	0,97
B	$\tau_T^{air} [\mu s]$	$0,16 \pm 0,05$	$7,9 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,5$
	$\tau_T^{N_2} [\mu s]$	31 ± 3	38 ± 4	33 ± 3
	f_{ET}	0,99	0,79	0,81
	$\tau_\Delta [\mu s]$	15 ± 2	11 ± 1	11 ± 1
	$\Phi_\Delta \pm 10\%$	0,52	0,07	0,08
C	$\tau_\Delta [\mu s]$	$0,50 \pm 0,05$	$0,70 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,05$
	$\tau_T^{air} [\mu s]$	$3,9 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,5$
	$I_\Delta^a [\%]$	100 ± 30	47 ± 14	29 ± 9
D	$\tau_T^{air} [\mu s]$	$1,8 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$
	$\tau_T^{N_2} [\mu s]$	35 ± 7	41 ± 24	68 ± 34
	f_{ET}	0,95	0,95	0,97

Tabelle 4: Übersicht über die Ergebnisse der photophysikalischen Untersuchungen an den mit Pheo beladenen HSA-NP,

(A) Pheo in EtOH; PHSA40 und PHSA100 in H_2O

(B) Pheo in EtOH; PHSA40 und PHSA100 in D_2O , $\lambda_{ex} = 673$ nm, $\lambda_{obs} = 488$ nm, Bengalrosa in D_2O dient als Standard für die Bestimmung von Φ_Δ

(C) Pheo, PHSA40 und PHSA100 in Jurkatzellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml) nach 5 h Inkubation, $\lambda_{ex} = 673$ nm, Laserleistung 1,5 mW, Bestrahlungsdauer: 20 s

(D) Pheo, PHSA40 und PHSA100 in Jurkatzellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml) nach 24 h Inkubation

		mTHPP	mTHPP-HSA100
A	$\tau_1[ns]$	$9,6 \pm 0,2$	$8,7 \pm 0,2$
	$\tau_2[ns]$	-	$1,3 \pm 0,1$
	$\tau_3[ns]$	-	-
	$\tau_4[ns]$		$0,02 \pm 0,02$
	χ^2	1,06	1,06
B	$\tau_T^{air} [\mu s]$	$0,31 \pm 0,05$	29 ± 3
	$\tau_T^{N_2} [\mu s]$	47 ± 2	91 ± 3
	f_{ET}	0,99	0,53
	$\tau_\Delta [\mu s]$	$15,2 \pm 0,5$	142 ± 3
	Φ_Δ	$0,63 \pm 0,6$	$0,04 \pm 0,03$

Tabelle 5: Übersicht über die Ergebnisse der photophysikalischen Untersuchungen an den mit mTHPP beladenen HSA100-NP,
 (A) Fluoreszenzlebensdauer von mTHPP in EtOH und mTHPP-HSA100 in H_2O (B) Triplettlebensdauer und 1O_2 -Generierung von mTHPP in EtOH und mTHPP-HSA100 in D_2O , $\lambda_{ex} = 532$ nm, $\lambda_{obs} = 650$ nm, Pheo in D_2O dient als Standard für die Bestimmung von Φ_Δ

In Tabelle 5 sind Ergebnisse der photophysikalischen Messungen an mit mTHPP beladenen HSA100-NP dargestellt.

Für mTHPP wurde als Monomer eine Fluoreszenzlebensdauer und im Gegensatz dazu in Verbindung mit HSA100-NP 3 Fluoreszenzlebensdauern bestimmt. Die Molekülwechselwirkungen, die diese zusätzlichen Fluoreszenzlebensdauern verursachen, verhindern eine effiziente 1O_2 -Generierung in den mTHPP-HSA100-NP. Dies belegen ebenfalls die im Vergleich zu freiem mTHPP sehr lange Triplettlebensdauer und die geringe 1O_2 -Quantenausbeute von mTHPP-HSA100.

		mTHPC	mTHPC-HSA40	mTHPC-HSA100	mTHPC-HSA200
A	$\tau_1[ns]$	$8,5 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$
	$\tau_2[ns]$	-	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
	$\tau_3[ns]$	-	$0,17 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,05$
	$\tau_4[ns]$	-	$0,027 \pm 0,01$	$0,042 \pm 0,01$	$0,045 \pm 0,01$
	χ^2	1,06	1,1	1,06	1,07
B	$\tau_T^{air} [\mu s]$		30 ± 3	36 ± 3	42 ± 3
	$\tau_\Delta [\mu s]$		67 ± 5	66 ± 5	55 ± 5
	$\Phi_\Delta \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,02$

Tabelle 6: Übersicht über die Ergebnisse der photophysikalischen Untersuchungen an den mit mTHPC beladenen HSA-NP

(A) Fluoreszenzlebensdauer von mTHPC in EtOH und mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100, mTHPC-HSA200 in H_2O

(B) Triplettlebensdauer und 1O_2 -Generierung von mTHPC in EtOH; mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100, mTHPC-HSA200 in D_2O , $\lambda_{ex} = 532$ nm, $\lambda_{obs} = 650$ nm, TPPS in D_2O dient als Standard für die Bestimmung von Φ_Δ ($\Phi_\Delta^{TPPS}=0,70$)

In Tabelle 6 sind Ergebnisse der photophysikalischen Messungen an mit mTHPC beladenen HSA40-, HSA100- und HSA200-NP dargestellt.

Analog zu den mit Pheo oder mTHPP beladenen HSA-NP zeigen auch die mit mTHPC beladenen HSA-NP starke mTHPC-Molekülwechselwirkungen, die sich in der Detektierbarkeit von vier verschiedenen Fluoreszenzlebensdauern, sehr langer Triplettlebensdauern unter Luftsättigung und sehr geringer 1O_2 -Quantenausbeuten messen lassen.

Monomeres mTHPC besitzt eine sehr gute Fähigkeit zur Generierung von 1O_2 , im Gegensatz dazu sind mit mTHPC beladenen HSA-NP fast komplett inaktiv.

2 Photophysikalische Charakterisierung der photoaktiven PLGA-Nanopartikel

Die in Tabelle 7 dargestellten photophysikalischen Untersuchungsergebnisse von mit mTHPP und mTHPC beladenen PLGA-NP zeigen, dass beide PS auch in Verbindung mit diesen NP sehr starke Molekülwechselwirkungen aufweisen.

Im Gegensatz zu den monomeren PS für welche jeweils nur eine Fluoreszenzlebensdauer detektiert wurde, konnten für mTHPP-PLGA und mTHPC-PLGA jeweils vier verschiedene Fluoreszenzlebensdauern gemessen werden. Diese starken Molekülwechselwirkungen verhindern eine effiziente 1O_2 -Generierung durch die an PLGA-NP gebundenen PS.

	mTHPP	mTHPP-PLGA	mTHPC	mTHPC-PLGA
$\tau_1[ns]$	$9,7 \pm 0,2$	-	$8,5 \pm 0,2$	-
$\tau_2[ns]$	-	$3,5 \pm 0,1$	-	$3,2 \pm 0,1$
$\tau_3[ns]$	-	$1,4 \pm 0,1$	-	$0,68 \pm 0,1$
$\tau_4[ns]$	-	$1,51 \pm 0,05$	-	$0,19 \pm 0,05$
$\tau_5[ns]$	-	$0,085 \pm 0,02$	-	$0,09 \pm 0,02$
χ^2	1,01	1,00	1,01	1,21

Tabelle 7: Fluoreszenzlebensdauer von mTHPP und mTHPC in EtOH und mTHPP-PLGA und mTHPC-PLGA in H_2O

In Tabelle 8 sind photophysikalische Messungen an mTHPP in verschiedenen Umgebungsmedien und *in vitro* Messungen an mit mTHPP beladenen PLGA-NP in Jurkatzellen dargestellt.

Die Fähigkeit eines PS 1O_2 zu generieren hängt unter Anderem von seiner Mikroumgebung und seinen Wechselwirkungen mit dieser Umgebung ab.

Sehr kurze Triplettlebensdauern, wie von mTHPP in Ethanol sprechen für eine starke Wechselwirkung mit Sauerstoff, und damit für effiziente 1O_2 -Generierung.

Die deutlich längeren Triplettlebensdauern von mTHPP in 10%igen FBS oder RPMI sprechen für Wechselwirkungen des mTHPP mit den Proteinen in seiner Umgebung und damit für eine deutlich verringerte Fähigkeit zur 1O_2 -Generierung. Die sehr lipophile Umgebung des mTHPP in der Liposomen führt zur deutlich kürzeren Triplettlebensdauer und damit zu einer besseren Fähigkeit zur 1O_2 -Generierung.

Diese verschiedenen Medien in denen die Triplettlebensdauer gemessen wurden, sind Modell für die verschiedenen Bestandteile humaner Zellen. Neben einer wässrigen Umgebung, in welcher mTHPP kaum löslich ist, stehen den Molekülen innerhalb der Zellen vor allem Proteine und Membranlipide als Mikroumgebung zur Verfügung.

Die relativ kurze Triplettabklingzeit von mTHPP nach 5 h Inkubation in Jurkatzellen spricht dafür, dass sich die Moleküle bevorzugt in lipidhaltigen Membranbestandteilen und nur wenig mit den intrazellulären Proteinen wechselwirken.

mTHPP beladene PLGA-NP zeigen in Wasser eine extrem lange Triplettlebensdauer und damit kaum eine Fähigkeit zur 1O_2 -Generierung. Die vielen Proteine im RPMI bewirken zu der weiterhin sehr langen Triplettlebensdauer, eine zweite charakteristische Triplettlebensdauer. mTHPP-Moleküle die diese zweite Triplettlebensdauer verursachen, befinden sich auf der Oberfläche der NP und können in Wechselwirkung mit den Proteinen der Umgebung treten. Dies verbessert die Fähigkeit zur 1O_2 -Generierung geringfügig.

Besonders interessant sind die Triplettlebensdauer-Messungen in Jurkatzellen zu verschiedenen Inkubationszeiten.

Die lange Triplettlebensdauer nach 1 h Inkubation zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt die mTHPP-Moleküle noch mit den NP verbunden sind und kaum eine Fähigkeit zur 1O_2 -Generierung besitzen.

Ab der dritten Stunde der Inkubation wurden nur noch relativ kurze Triplettlebensdauern gemessen. Die PLGA-NP sind demnach von der Zelle abgebaut worden, damit wurden die mTHPP-Moleküle in der Zelle freigesetzt, nun können sie mit anderen Bestandteilen der Zelle wechselwirken. Die kurzen Triplettlebensdauern sprechen dafür, dass sich mTHPP bevorzugt in biologischen Membranen anlagert.

In Tabelle 9 sind photophysikalische Messungen an mit mTHPC beladenen PLGA-NP dargestellt. Ein Teil der mit mTHPC beladenen PLGA-NP wurde für ein aktives Targeting modifiziert.

Für alle mit mTHPC beladenen PLGA-NP wurden je zwei Fluoreszenzlebensdauern gemessen. Die kürzere wird durch monomeres mTHPC verursacht. Die längere Fluoreszenzlebensdauer wird durch verschiedene Wechselwirkungen der mTHPC-Moleküle untereinander und mit dem NP verursacht.

Die langen Triplettlebensdauern in den NP und die sehr geringe 1O_2 -Quantenausbeute zeigen, dass diese Wechselwirkungen eine effiziente 1O_2 -Generierung in den NP verhindern.

	Mikro- umgebung	$\tau_{T1}^{air} [\mu s]/(A[\%])$	$\tau_{T2}^{air} [\mu s]/(A[\%])$
mTHPP	in EtOH	$0,31 \pm 0,05/(100)$	-
	in 10% FBS	$7,3 \pm 0,4/(100)$	-
	in RPMI	$9,2 \pm 0,3/(100)$	-
	in Liposomen	$1,8 \pm 0,2/(100)$	
	in Jurkatzellen 5 h	$3,0 \pm 0,02/(100)$	-
mTHPP- PLGA	in H_2O	-	$70 \pm 4/(100)$
	in RPMI	$7,9 \pm 0,6/(42)$	$86 \pm 5/(58)$
	in Jurkatzellen 1 h	-	$18 \pm 3/(100)$
	3 h	$3,4 \pm 0,3/(100)$	-
	5 h	$3,2 \pm 0,2/(100)$	-
	24 h	$2,7 \pm 0,2/(100)$	-

Tabelle 8: Triplettlebensdauer von mTHPP und mTHPP-PLGA in Abhängigkeit von der Mikroumgebung und *in vitro* nach verschiedenen Inkubationszeiten in Jurkatzellen

Gebunden an PLGA-NP ist das mTHPC als PS inaktiv.

Die sehr viel kürzeren Triplettlebensdauern aller mit mTHPC beladenen PLGA-NP nach 5 h Inkubation in Jurkatzellen (Zeile C) zeigen, dass zu diesem Zeitpunkt die NP bereits zu einem großen Teil innerhalb der Zellen abgebaut wurde und damit viele mTHPC-Moleküle freigesetzt sind. Das für alle Proben recht hohe 1O_2 -Signal (I_{Δ}^a) zeigt dass in allen Proben viel 1O_2 generiert wird. Die Modifizierung der NP scheint diesen Effekt jedoch signifikant abzuschwächen. Vermutlich geht der Abbau der modifizierten NP langsamer von statten als der der unmodifizierten PLGA-NP.

		mTHPC	mTHPC- PLGA ^a	mTHPC- PLGA-Erb	mTHPC- PLGA-IgG	mTHPC- PLGA-PEG
A	$\tau_1 [ns]/(A[\%])$	$8,5 \pm 0,2/(100)$	$0,32 \pm 0,05/(16)$	$0,35 \pm 0,05/(13)$	$0,38 \pm 0,05/(11)$	$0,35 \pm 0,05/(17)$
	$\tau_2 [ns]/(A[\%])$	-	$0,12 \pm 0,02/(84)$	$0,14 \pm 0,02/(87)$	$0,15 \pm 0,02/(89)$	$0,14 \pm 0,02/(83)$
	χ^2	1,01	1,30	0,94	1,01	0,96
B	$\tau_\Delta [\mu s]$		$5,0 \pm 0,5$	13 ± 1	$5,5 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,5$
	$\tau_T^{air} [\mu s]$		59 ± 2	77 ± 3	87 ± 4	79 ± 4
	$\Phi_\Delta [\mu s]$		$0,03 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,03$	$0,05 \pm 0,03$
C	$\tau_\Delta [\mu s]$	$0,75 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,05$	$0,60 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,05$	$0,60 \pm 0,05$
	$\tau_T^{air} [\mu s]$	$3,8 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$
	$I_\Delta^a [\%]$	100	106	76	87	69

Tabelle 9: Photophysikalische Messungen an mTHPC in Ethanol und an AK-modifizierten mTHPC-PLGA-Nanopartikeln in H_2O (A), in D_2O (B) und *in vitro* (C) nach 5 h Inkubation in Jurkatzellen

Abkürzungen

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	bovines Serumalbumin
CLSM	konfokale Laserscanning Mikroskopie <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
EGFR	epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor <i>epidermal growth factor receptor</i>
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erb	Erbitux
FBS	fötales bovines Serum
FL	Fluoreszenzlebensdauer
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging</i>
GB	Glutaraldehydbrücken
HSA	Humanes Serumalbumin <i>human serum albumin</i>
IgG	Immunglobulin G
ISC	<i>Inter System Crossing</i>
IC	<i>Internal Conversion</i>
LED	Licht emittierende Diode
LFP	Laserflashphotolyse
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>

Abkürzungen

MilliQ	Reinstwasser
NAF	<i>Nuclear Area Factor</i>
NP	Nanopartikel
OD	optische Dichte
OPO	optisch parametrischer Oszillator
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDT	Photodynamische Therapie <i>photodynamic therapy</i>
PS	Photosensibilisatoren <i>photosensitizer</i>
Ref	Referenz
SD	Standardabweichung
UV	Ultraviolette Strahlung
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
λ_{obs}	Beobachtungswellenlänge
Φ_{Δ}	Singuletsauerstoff-Quantenausbeute
Φ_{fl}	Fluoreszenzquantenausbeute
$\tau_{1,2,3,..}$	Fluoreszenzlebensdauer
τ_T^{air/N_2}	Triplettlebensdauer

Chemische Formeln

D_2O	Deuterium
EtOH	Ethanol
H_2O	Wasser
mTHPC	Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Chlorin <i>meta-tetra(hydroxy-phenyl)-chlorin</i>
mTHPP	Meta-Tetra (Hydroxy-Phenyl)-Porphyrin <i>meta-tetra(hydroxy-phenyl)-porphyrin</i>

N_2	Stickstoff
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PEG	Polyethylenglykol
Pheo	Phäophorbid a <i>pheophorbide a</i>
PLGA	Polylactid-co-Glycolid <i>poly (lactic-co-glycolic acid)</i>
O_2	Sauerstoff
1O_2	Singulett-sauerstoff
SMA	Styren-Maleinsäure
TPPS	5, 10, 15, 20-Tetraphenyl-21H, 23H-Porphin-p,p',p'',p'''-Tetra-Schwefelsäure, Tetra-Natriumhydrat

Danksagung

Ohne die geduldige Unterstützung von Frau Professor Beate Röder wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Deshalb möchte ich mich herzlich bei ihr dafür bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat dieses interessante Thema in ihrer Arbeitsgruppe zu bearbeiten und meine Arbeit in vielen Diskussionen und mit zahlreichen Ratschlägen betreut hat. Dankbar bin ich auch für die von ihr ermöglichte Teilnahme an verschiedenen Konferenzen, welche mir immer wieder neue Einblicke in die Thematik der PDT und in verschiedene experimentelle Untersuchungsmethoden gegeben haben.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Zurverfügungstellung der von ihnen synthetisierten HSA- und PLGA-NP-Systeme möchte ich auch Herrn Professor Klaus Langer und seinen Mitarbeitern Matthias Wacker und Thomas Knobloch danken.

Einen großen Anteil am Erfolg meiner Arbeit hat das freundliche Arbeitsklima der Arbeitsgruppe Photobiophysik. Die aufgeschlossene und hilfsbereite Art meiner Kolleginnen und Kollegen und ihr humorvoller Umgang miteinander und die vielen Diskussionen beim gemeinsamen Mittagessen machen die Arbeit hier sehr angenehm.

Aus der Arbeitsgruppe möchte ich auch Kuan Chen danken, seine photophysikalischen Messungen an den verschiedenen NP-Systemen waren eine wichtige Grundlage für meine *in vitro* Untersuchungen.

Carmen Ludwig und Judith Pohl möchte ich für ihre Hilfe im Zellkulturlabor und vor allem Judith für viele Lösungen diverser Computerprobleme danken. Steffen Hackbarth gilt großer Dank für seine Geduld und Assistenz an langen Messtagen im Dunkeln am CLSM und FLIM und bei vielen kleinen Fragen. Lutz Jäger betreut das Chemielabor der Arbeitsgruppe und stand bei vielen Problemen hilfreich zur Seite, auch dafür vielen Dank.

Ich habe im Rahmen meiner Arbeit sechs Monate am Trinity College Dublin in Irland verbracht. Diese für mich sehr spannende Zeit wurde mir von Herrn Professor Mathias O. Senge ermöglicht, in dessen Arbeitsgruppe ich sehr herzlich aufgenommen wurde. Auch für die Bereitschaft als Gutachter für diese Arbeit zu fungieren möchte ich Herrn Professor Mathias O. Senge danken.

Ebenfalls für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten möchte ich Herrn Prof. Marc Schneider danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinem Liebsten Daniel und meinen Freunden für die Unterstützung und Ablenkung bedanken.

Literaturverzeichnis

- [1] *Caspase-Glo® 3/7 Assay, instructions for the use of products G8090, G8091, G8092 AND G8093*
- [2] *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. : CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*
- [3] *Hoechst Stains Hand Book*. 2010
- [4] ABDEL-MOTTALEB, M. M. A. ; NEUMANN, D. ; LAMPRECHT, A.: In vitro drug release mechanism from lipid nanocapsules (LNC). In: *International Journal of Pharmaceutics* 390(2) (2010), S. 208–213
- [5] ADAMS, G. P. ; SCHIER, R. ; MCCALL, A. M. ; CRAWFORD, R. S. ; WOLF, E. J. ; WEINER, L. M. ; MARKS, J. D.: Prolonged in vivo tumor retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human her2/neu. In: *British Journal of Cancer* 77 (1998), S. 1405–1412
- [6] AGARWAL, M. L. ; CLAY, M. E. ; HARVEY, E. J. ; EVANS, H. H. ; ANTUNEZ, A. R. ; OLEINICK, N. L.: Photodynamic Therapy Induces Rapid Cell Death by Apoptosis in LSI78Y Mouse Lymphoma Cells. In: *Cancer Research* 51 (1991), S. 5993–5996
- [7] AGOSTINIS, P. ; VANTIEGHEMA, A. ; MERLEVEDE, W. ; WITTE, P. A.: Hypericin in cancer treatment: more light on the way. In: *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2002), S. 221–241
- [8] ALEXIOU, C. ; ARNOLD, W. ; KLEIN, R. J. ; PARAK, F. G. ; HULIN, P. ; BERGEMANN, C. ; ERHARDT, W. ; WAGENPFEIL, S. ; LÜBBE, A. S.: Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. In: *Cancer Research* 60 (2000), S. 6641–6648
- [9] ALEXIOU, C. ; SCHMID, R. J. ; JURGONS, R. ; KREMER, M. ; WANNER, G. ; BERGEMANN, C. ; HUENGES, E. ; NAWROTH, T. ; ARNOLD, W. ; PARAK, F. G.: Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. In: *European biophysics journal* 35 (2006), S. 446–450
- [10] ALLEN, T. M. ; CULLIS, P. R.: Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. In: *Science* 303 (2004), S. 1818–1822
- [11] ALLEN, T. M. ; HANSEN, C.: Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1068 (1991), Nr. 2, S. 133 – 141

- [12] AMATO, I.: Cancer therapy. Hope for a magic bullet that moves at the speed of light. In: *Science* 262 (1993), S. 32–33
- [13] ARMATAS, G. S. ; KANATZIDIS, M. G.: Mesostructured germanium with cubic pore symmetry. In: *Nature* 441 (2006), S. 1122–1125
- [14] ATTARD, G. S. ; BARTLETT, P. N. ; COLEMAN, N. R. B. ; ELLIOTT, J. M. ; OWEN, J. R. ; WANG, J. H.: Mesoporous Platinum Films from Lyotropic Liquid Crystalline Phases. In: *Science* 278 (1997), S. 838–840
- [15] AULER, H. ; BANZER, G.: Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. In: *Zeitschrift für Krebsforschung* 53 (1942), S. 65–68
- [16] AVELINE, B. M. ; REDMOND, R. W.: Can cellular phototoxicity be accurately predicted on the basis of sensitizer photophysics? In: *Photochemistry and Photobiology* 69 (1999), S. 306–316
- [17] AVELINE, B. M. ; SATTLER, R. M. ; REDMOND, R. W.: Environmental effects on cellular photosensitization: correlation of phototoxicity mechanism with transient absorption spectroscopy measurements. In: *Photochemistry and Photobiology* 68 (1998), S. 51–62
- [18] BAISH, J. W. ; STYLIANOPOULOS, T. ; LANNING, R.M. ; KAMOUN, W. S. ; FUKUMURA, D. ; MUNN, L. L. ; JAIN, R. K.: Scaling rules for diffusive drug delivery in tumor and normal tissues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (2011), S. 1799–1803
- [19] BALA, I. ; HARIHARAN, S. ; KUMAR, M. N. V. R.: PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art. In: *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 21(5) (2004), S. 387–422
- [20] BAYLY, J. G. ; KARTHA, V. B. ; STEVENS, W. H.: The absorption spectra of liquid phase H₂O, HDO and D₂O from 0.7 μ m to 10 μ m. In: *Infrared Physics* 3 (1963), S. 211 – 222
- [21] BECHET, D. ; COULEAUD, P. ; FROCHOT, C. ; VIRIOT, M.-L. ; GUILLEMIN, F. ; B.-HEYOB, M.I.: Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. In: *Trends in Biotechnology* 26 (2008), S. 612 – 621
- [22] BENSASSON, R. V. ; LAND, E. J. ; TRUSCOTT, T. G. ; PRESS, Oxford U. (Hrsg.): *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, 1993
- [23] BERLANDA, J. ; KIESSLICH, T. ; OBERDANNERAND, C. B. ; OBERMAIR, F. J. ; KRAMMER, B. ; PLAETZER, K.: Characterization of Apoptosis Induced by Photodynamic Treatment with Hypericin in A431 Human Epidermoid Carcinoma Cells. In: *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology* 25 (2006), S. 173–188

- [24] BERTRAND, R. ; SOLARY, E. ; O'CONNER, P. ; KOHN, K. W. ; POMMIER, Y.: Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine of outstanding interest. In: *Experimental Cell Research* 211 (1994), S. 314–321
- [25] BIDÈRE, N. ; LORENZO, H. K. ; CARMONA, S. ; LAFORGE, M. ; HARPER, F. ; DUMONT, C. ; SENIK, A.: Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 31401–31411
- [26] *Kapitel Photodynamic Therapy of Head and Neck Cancers.* In: BIEL, Merrill A.: *Photodynamic Therapy.* Humana Press, 2010, S. 281–293
- [27] BIOLO, R. ; JORI, G. ; SONCIN, M. ; RIHTER, B. ; KENNEY, M. E. ; RODGERS, M. A.: Effect of photosensitizer delivery system and irradiation parameters on the efficiency of photodynamic therapy of B16 pigmented melanoma in mice. In: *Photochemistry and Photobiology* 63 (1996), S. 224–228
- [28] BLUM, H. F.: Photodynamic action and diseases caused by light. In: *Journal of the Franklin Institute* 232 (3) (1941), S. 290–291
- [29] BORGIA, S. L. ; REGEHLI, M. ; SIVARAMAKRISHNAN, R. ; MEHNERT, W. ; KORTING, H. C. ; DANKER, K. ; RÖDER, B. ; KRAMER, K.D. ; SCHAEFER-KORTING, M.: Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. In: *Journal of Controlled Release* 110 (2005), S. 151– 163
- [30] BRAULT, D.: Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: The importance of pH. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 6 (1990), S. 79 – 86
- [31] BUYTAERT, E. ; DEWAELE, M. ; AGOSTINIS, P.: Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1776 (2007), S. 86 – 107. – ISSN 0304-419X
- [32] BUYTAERT, E. ; MATROULE, J. Y. ; DURINCK, S. ; CLOSE, P. ; KOCANOVA, S. ; VANDENHEEDE, J. R. ; WITTE, P.A. de ; PIETTE, J. ; AGOSTINIS, P.: Molecular effectors and modulators of hypericin-mediated cell death in bladder cancer cells. In: *Oncogene* 27 (2008), S. 1916–1929
- [33] CARTER, D. C. ; HO, J. X.: Structure of serum albumin. In: *Advances in Protein Chemistry* 45 (1994), S. 153–203
- [34] CARVALHO GOULART, R. de ; BOLEAN, M. ; PAIVA PAULINO, T. de ; THEDEL, G. ; SOUZA, S. L. S. ; TEDESCO, A. C. ; CIANCAGLINI, P.: Photodynamic Therapy in Planktonic and Biofilm Cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. In: *Photomedicine and Laser Surgery* Epub ahead of print (2009), S. –

- [35] CHATTERJEE, D. K. ; FONG, L. S. ; ZHANG, Y.: Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008), S. 1627 – 1637. – ISSN 0169–409X
- [36] CHEN, K.: *Photophysical characterization and optimization of novel polymer based photosensitizer carrier systems for PDT*, Humboldt- Universität zu Berlin, Institut für Physik, Diss., 2010
- [37] CHEN, K. ; PREUSS, A. ; HACKBARTH, S. ; WACKER, M. ; LANGER, K. ; RÖDER, B.: Novel photosensitizer-protein nanoparticles for Photodynamic Therapy: Photophysical characterization and in vitro investigations. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96 (2009), S. 66–74
- [38] CHITHRANI, B. D. ; GHAZANI, A. A. ; CHAN, W. C. W.: Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. In: *Nano Letters* 6 (2006), S. 662–668
- [39] CHOMOUCKA, J. ; DRBOHLAVOVA, J. ; HUSKA, D. ; ADAM, V. ; KIZEK, R. ; HUBALEK, J.: Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. In: *Pharmacological Research* 62 (2010), S. 144 – 149. – Towards clinical applications of nanoscale medicines
- [40] CONNER, S. D. ; SCHMID, S. L.: Regulated portals of entry into the cell. In: *Nature* 422 (2003), S. 37–44
- [41] DASTJERDI, Roya ; MONTAZER, Majid: A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79 (2010), S. 5 – 18
- [42] DECOSTER, M. A.: The Nuclear Area Factor (NAF): a measure for cell apoptosis using microscopy and image analysis. In: *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* 3 (2007), S. 378–384
- [43] DEMIDOVA, T. N. ; HAMBLIN, M. R.: Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(6) (2005), S. 2329–2335
- [44] DENTUTO, P. L. ; CATUCCI, L. ; COSMA, P. ; FINI, P. ; AGOSTIANO, A. ; HACKBARTH, S. ; RANCAN, F. ; ROEDER, B.: Cyclodextrin/chlorophyll a complexes as supramolecular photosensitizers. In: *Bioelectrochemistry* 70 (2007), S. 39–43
- [45] DOLPHIN, D.: Photomedicine and photodynamic therapy. In: *Canadian Journal of Chemistry* 72(4) (1994), S. 1005–1013
- [46] DOUGHERTY, T. J.: Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. In: *Cancer Research* 38 (1978), S. 2628–2635

- [47] DOUGHERTY, T. J. ; GOMER, C. J. ; HENDERSON, B. W. ; JORI, G. ; KESSEL, D. ; KORBELIK, M. ; MOAN, J. ; PENG, Q.: Photodynamic therapy. In: *Journal of the National Cancer Institute* 90 (1998), S. 889–905
- [48] DOUGHERTY, T. J. ; GRINDEY, G. B. ; FIEL, R. ; WEISHAUP, K. R. ; BOYLE, D. G.: Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. In: *Journal of the National Cancer Institute* 55 (1975), S. 115–21
- [49] DUNCAN, B. ; KIM, C. ; ROTELLO, V. M.: Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. In: *Journal of Controlled Release* In Press, Corrected Proof (2010), S. –
- [50] DUNCAN, R. ; SAT, Y. N.: Tumor targeting by enhanced permeability and retention (EPR) effect. In: *Annals of Oncology* 9(2) (1998), S. 39–52
- [51] DVORAK, H. F. ; BROWN, L. F. ; DETMAR, M. ; DVORAK, A. M.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. In: *American Journal of Pathology* 146(5) (1995), S. 1029–1039
- [52] FADOK, V. A. ; CATHELINEAU, A. de ; DALEKE, D. L. ; HENSON, P. M. ; BRATTON, D. L.: Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), S. 1071–1077
- [53] FARAJI, A. H. ; WIPF, P.: Nanoparticles in cellular drug delivery. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17 (2009), S. 2950 – 2962
- [54] FEEST, C.: *Characterization and in vitro testing of novel photosensitizers*, Humboldtuniversität zu Berlin, Institut für Physik, AG Photobiophysik, Diplomarbeit, 2009
- [55] FIREY, P. A. ; FORD, W. E. ; SOUNIK, J. R. ; KENNEY, M. E. ; RODGERS, M. A. J.: Silicon naphthalocyanine triplet state and oxygen. A reversible energy-transfer reaction. In: *Journal of the American Chemical Society* 110 (23), pp (1988), S. 7626–7630
- [56] FOOTE, C. S.: Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. In: *Science* 162 (1968), S. 963–970
- [57] FOOTE, C. S.: Definition of type I and type II photosensitized oxidation. In: *Photochemistry and Photobiology* 54(5) (1991), S. 659
- [58] FOSTER, T. H. ; PEARSON, B. D. ; MITRA, S. ; BIGELOW, C. E.: Fluorescence Anisotropy Imaging Reveals Localization of *meso*-Tetrahydroxyphenyl Chlorin in the Nuclear Envelope. In: *Photochemistry and Photobiology* 81 (2005), S. 1544–1547

- [59] FRIBERG, E. G. ; CUNDERLÍKOVÁ, B. ; PETTERSEN, E. O. ; MOAN, J.: pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. In: *Cancer Letters* 195 (2003), S. 73 – 80
- [60] FUKUMURA, D. ; YUAN, F. ; MONSKY, W. L. ; CHEN, Y. ; JAIN, R. K.: Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. In: *American Journal of Pathology* 151(3) (1997), S. 679–688
- [61] GEORGAKOUDI, I. ; FOSTER, T. H.: Singlet Oxygen Versus Nonsinglet Oxygen-Mediated Mechanisms of Sensitizer Photobleaching and Their Effects on Photodynamic Dosimetry. In: *Photochemistry and Photobiology* 67 (1998), S. 612–625
- [62] GEORGE, S. ; HAMBLIN, M. R. ; KISHEN, A.: Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. In: *Photochemical and Photobiological Sciences* 8(6) (2009), S. 788–95
- [63] GERLOWSKI, L. E. ; JAIN, R. K.: Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. In: *Microvascular Research* 31 (1986), S. 288 – 305
- [64] GOLDSTEIN, P. ; OJCIUS, D. ; YOUNG, J. D.: Cell death mechanisms and the immune system. In: *Immunological Reviews* 121 (1991), S. 29
- [65] GOVENDER, T. ; RILEY, T. ; EHTEZAZI, T. ; GARNETT, M. C. ; STOLNIK, S. ; ILLUM, L. ; DAVIS, S. S.: Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics* 199 (2000), S. 95 – 110
- [66] GOVENDER, T. ; STOLNIK, S. ; GARNETT, M. C. ; ILLUM, L. ; DAVIS, S. S.: PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. In: *Journal of Controlled Release* 57 (1999), S. 171 – 185
- [67] GREEN, D. R. ; REED, J. C.: Mitochondria and Apoptosis. In: *Science* 281 (1998), S. 1309 – 1312
- [68] GREENMAN, C. ; STEPHENS, P. ; SMITH, R. ; DALGLIESH, G. L. ; HUNTER, C. ; BIGNELL, G. ; DAVIES, H. ; TEAGUE, J. ; BUTLER, A. ; STEVENS, C. ; EDKINS, S. ; O’MEARA, S. ; VASTRIK, I. ; SCHMIDT, E. E. ; AVIS, T. ; BARTHORPE, S. ; BHAMRA, G. ; BUCK, G. ; CHOUDHURY, B. ; CLEMENTS, J. ; COLE, J. ; DICKS, E. ; FORBES, S. ; GRAY, K. ; HALLIDAY, K. ; HARRISON, R. ; HILLS, K. ; HINTON, J. ; JENKINSON, A. ; JONES, D. ; MENZIES a. ; MIRONENKO, T. ; PERRY, J. ; RAINE, K. ; RICHARDSON, D. ; SHEPHERD, R. ; SMALL, A. ; TOFTS, C. ; VARIAN, J. ; WEBB, T. ; WEST, S. ; WIDAA, S. ; YATES, A. ; CAHILL, D. P. ; LOUIS, D. N. ; GOLDSTRAW, P. ; NICHOLSON, A. G. ; BRASSEUR, F. ; LOOIJENGA, L. ; WEBER, B. L. ; CHIEW, Y. ; DEFazio, A. ; GREAVES, M. F. ; GREEN, A. R. ; CAMPBELL, P. ; BIRNEY, E. ; EASTON, D. F. ; CHENEVIX-TRENCH, G. ; TAN, M.-H. ; KHOO, S. K. ; TEH, B. T. ; YUEN, S. T. ; LEUNG, S. y. ; WOOSTER, R. ; FUTREAL, P. A. ; STRATTON, M. R.: Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. In: *Nature* 446 (2007), S. 153–158

- [69] *Kapitel Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols.* In: GREISH, Khaled: *Methods in Molecular Biology*. Bd. 624: *Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting*. Springer Link, 2010, S. 25–37
- [70] GRINHOLC, M. ; SZRAMKA, B. ; OLENDER, K. ; GRACZYK, A.: Bactericidal effect of photodynamic therapy against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain with the use of various porphyrin photosensitizers. In: *Acta Biochimica Polonica* 54 (2007), S. 665–670
- [71] GRIZZI, I. ; GARREAU, H. ; LI, S. ; VERT, M.: Hydrolytic degradation of devices based on poly(-lactic acid) size-dependence. In: *Biomaterials* 16 (1995), S. 305 – 311
- [72] HACKBARTH, S.: *Dendrimere als Multiplier in Modularen Carrier-Systemen für die Photodynamische Therapie - Photophysikalische Untersuchung von Dendrimer-Farbstoff-Konjugaten*, Humboldt-Universität zu Berlin, Diss., 2000
- [73] HACKBARTH, S. ; ERMILOV, E. A. ; ROEDER, B.: Interaction of Pheophorbide a molecules covalently linked to DAB dendrimers. In: *Optics Communications* 248 (2005), S. 295–306
- [74] HACKBARTH, S. ; HONEFFER, V. ; WIEHE, A. ; HILLENKAMP, F. ; RÖDER, B.: Photophysical properties of pheophorbide-a-substituted diaminobutane poly-propyleneimine dendrimer. In: *Chemical Physics* 269 (2001), S. 339–346
- [75] HAMBLIN, M. R. ; HASAN, T.: Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? In: *Photochemical and Photobiological Sciences* 3 (2004), S. 436–450
- [76] HAMBLIN, M. R. ; ORTEL, B.: Chapter 22 Future directions – photosensitizer targeting and new disease indications. In: PIERGIACOMO CALZAVARA-PINTON, Rolf-Markus S. (Hrsg.) ; ORTEL, Bernhard (Hrsg.): *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology* Bd. 2. Elsevier, 2001, S. 339 – 366
- [77] HARA, T. ; IRIYAMA, S. ; MAKINO, K. ; TERADA, H. ; OHYA, M.: Mathematical description of drug movement into tumor with EPR effect and estimation of its configuration for DDS. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75 (2010), Nr. 1, S. 42 – 46
- [78] HARRIS, A. L. .. ; HOCHHAUSER, D.: Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Treatment. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 31(2) (1992), S. 205–213
- [79] HATZ, S. ; LAMBERT, J. D. ; OGILBY, P. R.: Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. In: *Photochem Photobiol Science* 6(10) (2007), S. 1106–16

- [80] HE, Q. ; SHI, J. ; CHEN, F. ; ZHU, M. ; ZHANG, L.: An anticancer drug delivery system based on surfactant-templated mesoporous silica nanoparticles. In: *Biomaterials* 31 (2010), S. 3335 – 3346
- [81] HE, X. M. ; CARTER, D. C.: Atomic structure and chemistry of human serum albumin. In: *Nature* 358 (1992), S. 209–215
- [82] HENDERSON, B.W. ; DOUGHERTY, T.J.: How does photodynamic therapy work? In: *Photochemistry and Photobiology* 55 (1992), S. 145–157
- [83] HENGARTNER, M. O.: The biochemistry of apoptosis. In: *Nature* 407 (2000), S. 770–776
- [84] HOBBS, S. K. ; MONSKY, W. L. ; YUAN, F. ; ROBERTS, W. G. ; GRIFFITH, L. ; TORCHILIN, V. P. ; JAIN, R. K.: Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998), S. 4607–4612
- [85] HONG, H. ; ZHANG, Y. ; SUN, J. ; CAI, W.: Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. In: *Nano Today* 4 (2009), S. 399 – 413
- [86] HORVITZ, H. R.: Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: *Cancer Research* 59(7 Suppl) (1999), S. 1701s–1706s
- [87] HUR, C. ; NISHIOKA, N. S. ; GAZELLE, G. S.: Cost-Effectiveness of Photodynamic Therapy for Treatment of Barrett’s Esophagus with High Grade Dysplasia. In: *Digestive Diseases and Sciences* 48 (2003), S. 1273–1283
- [88] JABR-MILANE, L. S. ; VLERKEN, L. E. ; YADAV, S. ; AMIJI, M. M.: Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. In: *Cancer Treatment Reviews* 34 (2008), S. 592 – 602
- [89] JAIN, R. K.: Transport of Molecules, Particles, and Cells in Solid Tumors. In: *Annual Review of Biomedical Engineering* 1 (1999), S. 241–263
- [90] JASINSKI, S. ; ERMILOV, E. A. ; JUX, N. ; RÖDER, B.: Novel Synthetic Cycloketo-Tetraphenylporphyrins. In: *European Journal of Organic Chemistry* 10 (2007), S. 1075–1084
- [91] JORI, G.: Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. In: *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 25 (2006), S. 505–519
- [92] JORI, G. ; FABRIS, C. ; SONCIN, M. ; FERRO, S. ; COPPELLOTTI, O. ; DEI, D. ; FANTETTI, L. ; CHITI, G. ; RONCUCCI, G.: Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. In: *Lasers in Surgery and Medicine* 38 (2006), S. 468–481

- [93] Kapitel Targeting Strategies for tetrapyrrole-based Photodynamic Therapy. In: JUX, N. ; RÖDER, B.: *Handbook of Porphyrin Science*. Bd. 4, Phototherapy, Radioimmunotherapy and Imaging. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore, 2010, S. 325–401
- [94] KATO, H.: Photodynamic therapy for lung cancer – A review of 19 years' experience. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 42 (1998), S. 96 – 99. – ISSN 1011–1344
- [95] KERR, J. F. ; WYLLIE, A. H. ; CURRIE, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. In: *British Journal of Cancer* 26 (1972), S. 239–247
- [96] KESSEL, D. ; LUO, Y.: Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 42 (1998), S. 89–95
- [97] KÅGEDAL, K. ; ZHAO, M. ; SVENSSON, I. ; BRUNK, U. T.: Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. In: *Biochemical Journal* 15 (2001), S. 335–343
- [98] KHDAIR, A. ; CHEN, D. ; PATIL, Y. ; MA, L. ; D., Q. P. ; SHEKHAR, M. P. ; PANYAM, J.: Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. In: *Journal of Controlled Release* 141 (2010), Nr. 2, S. 137 – 144
- [99] KIESSLICH, T. ; BERLANDA, J. ; PLAETZE, K. ; KRAMMER, B. ; BERR, F.: Comparative characterization of the efficiency and cellular pharmacokinetics of Foscan - and Foslip -based photodynamic treatment in human biliary tract cancer cell lines. In: *Photochemical and Photobiological Sciences* 6 (2007), S. 619–627
- [100] KIESSLICH, T. ; KRAMMER, B. ; PLAETZER, K.: Cellular Mechanisms and Prospective Applications of Hypericin in Photodynamic Therapy. In: *Current Medicinal Chemistry* 13 (2006), S. 2189–2204
- [101] KIESSLICH, T. ; OBERDANNER, C. B. ; KRAMMER, B. ; PLAETZER, K.: Fast and reliable determination of intracellular ATP from cells cultured in 96-well microplates. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 57 (2003), S. 247–251
- [102] KIESSLICH, T. ; PLAETZER, K. ; O., C. B. ; BERLANDA, J. ; OBERMAIR, F. J. ; KRAMMER, B.: Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction. In: *FEBS Letters* 579 (2005), S. 185–190
- [103] KONAN, Y. N. ; BERTON, M. ; GURNY, R. ; ALLÉMANN, E.: Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 18 (2003), S. 241 – 249

- [104] KONAN, Y. N. ; GURNY, R. ; ALLÉMANN, E.: State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 66 (2002), S. 89 – 106
- [105] KONAN, Y. N. ; CERNY, R. ; FAVET, J. ; BERTON, M. ; GURNY, R. ; ALLÉMANN, E.: Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxylphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55 (2003), S. 115 – 124
- [106] KOPECEK, J. ; KOPECKOVÁ, P. ; MINKO, T. ; LU, Z. R. ; PETERSON, C. M.: Water soluble polymers in tumor targeted delivery. In: *Journal of Controlled Release* 74 (2001), S. 147 – 158
- [107] KRAMMER, P.: CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. In: *Advances in Immunology* 71 (1999), S. 163–210
- [108] KRASNOVSKY, A. A. ; NEVEROV, K. V. ; EGOROV, S. Y. ; ROEDER, B. ; LEVALD, T.: Photophysical studies of pheophorbide a and pheophytin a. Phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminescence. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 5(2) (1990), S. 245–54
- [109] KRATZ, F.: Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. In: *Journal of Controlled Release* 132 (2008), S. 171–183
- [110] KROEMER, G. ; GALLUZZI, L. ; BRENNER, C.: Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. In: *Physiological Reviews* 87 (2007), S. 99–163
- [111] KWON, H.-Y. ; LEE, J.-Y. ; CHOI, S.-W. ; JANG, Y. ; KIM, J.-H.: Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 182 (2001), S. 123 – 130. – ISSN 0927–7757
- [112] LANGER, K. ; ANHORN, M.G. ; STEINHAUSER, I. ; DREIS, S. ; CELEBI, D. ; SCHRICKEL, N. ; FAUST, S. ; VOGEL, V.: Human serum albumin (HSA) nanoparticles: reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. In: *International Journal of Pharmaceutics* 347 (2008), S. 109–117
- [113] LANGER, K. ; BALTHASAR, S. ; VOGEL, V. ; DINAUER, N. ; BRIESEN, H. von ; SCHUBERT, D.: Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics* 257 (2003), S. 169–180
- [114] LANGER, K. ; COESTER, C. ; BRIESEN, H. von ; KREUTER, J.: Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid (PNA). In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49 (2000), S. 303–307

- [115] LAUSTRIAT, G.: Molecular mechanisms of photosensitization. In: *Biochimie* 68 (1986), S. 771 – 778
- [116] LEE, W. Y. ; LIM, D. S. ; KO, S. H. ; PARK, Y. J. ; RYU, K. S. ; AHN, M. Y. ; KIM, Y. R. ; LEE, D. W. ; CHO, C. W.: Photoactivation of pheophorbide a induces a mitochondrial-mediated apoptosis in Jurkat leukaemia cells. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology* 75 (2004), S. 119– 126
- [117] LEUNG, W. N. ; SUN, X. ; MAK, N. K. ; YOW, C. M.: Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. In: *Photochemistry and Photobiology* 75 (2002), S. 406–411
- [118] LISTER-JAMES, J. ; MOYER, B. R. ; DEAN, T.: Small peptides radiolabeled with ^{99m}Tc. In: *Quartal Journal of Nuclear Medicine* 40 (1996), S. 221–233
- [119] LOCKSHIN, R. A. ; WILLIAMS, C. M.: Programmed cell death–I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth. In: *Journal of Insect Physiology* 11 (1965), S. 123 – 126, IN1–IN5, 127–133
- [120] LOUDOS, G. ; KAGADIS, G. C. ; PSIMADAS, D.: Current status and future perspectives of in vivo small animal imaging using radiolabeled nanoparticles. In: *European Journal of Radiology* In Press, Corrected Proof (2010), S. –
- [121] LUDWIG, C.: *Singulett-sauerstoff-Generierung und Quenching in photosensibilisierten Zellen*, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Physik, AG Photobiophysik, Diplomarbeit, 2010
- [122] MA, L. ; MOAN, J. ; BERG, K.: Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: a comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. In: *International Journal of Cancer* 57 (1994), S. 883–888
- [123] *Kapitel Polymeric Site-specific Pharmacotherapy*. In: MAEDA, H.: *Polymer conjugated macromolecular drugs for tumor-specific targeting*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994, S. 96–116
- [124] MAEDA, H.: Nitroglycerin enhances vascular blood flow and drug delivery in hypoxic tumor tissues: Analogy between angina pectoris and solid tumors and enhancement of the EPR effect. In: *Journal of Controlled Release* 142 (2010), S. 296 – 298
- [125] MAEDA, H.: Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects. In: *Bioconjugate Chemistry* 21 (2010), S. 797–802
- [126] MAEDA, H. ; BHARATE, G. Y. ; DARUWALLA, J.: Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71 (2009), S. 409 – 419

- [127] MAEDA, H. ; SAWAA, T. ; KONNO, T.: Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. In: *Journal of Controlled Release* 74 (2001), S. 47–61
- [128] MAISCH, T.: Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? In: *Lasers in Medical Science* 22 (2007), S. 83–91
- [129] MAISCH, T. ; BAIER, J. ; FRANZ, B. ; MAIER, M. ; LANDTHALER, M. ; SZEIMIES, R.-M. ; BÄUMLER, W.: The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Science* 104(17) (2007), S. 7223–8
- [130] MAISCH, T. ; SZEIMIES, R.-M. ; JORI, G. ; ABELS, C.: Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. In: *Photochemical and Photobiological Sciences* 3 (2004), S. 907–917
- [131] MAKAROV, S. ; LITWINSKI, C. ; ERMILOV, E. A. ; SUVOROVA, O. ; RÖDER, B. ; WÖHRLE, D.: Synthesis and photophysical properties of annulated dinuclear and trinuclear phthalocyanines. In: *Chemistry - A European Journal* 12 (2006), S. 1468–1474
- [132] MARCHAL, S. ; BEZDETNYA, L. ; GUILLEMIN, F.: Modality of cell death induced by Foscan-based photodynamic treatment in human colon adenocarcinoma cell line HT29. In: *Biochemistry (Moscow)* 69 (2004), S. 45–49
- [133] MATSAMURA, Y. ; MAEDA, H.: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanisms of tumoritropic accumulation of protein and the antitumor agent SMANCS. In: *Cancer Research* 46 (1986), S. 6387–6392
- [134] MEYER-BETZ, F.: Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffes. In: *Deutsches Archiv für klinische Medizin* 112 (1913), S. 476–503
- [135] MOAN, J. ; PENG, Q.: An outline of the hundred-year history of PDT. In: *Anticancer Research* 23(5A) (2003), S. 3591–600
- [136] MOGHIMI, S. M. ; HUNTER, A. C. ; MURRAY, J. C.: Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. In: *Pharmacological Reviews* 53 (2001), S. 283–318
- [137] MOSER, J. G.: Attempts to treat malignant melanoma by photodynamic therapy using bacteriopheophorbide esters as the sensitizer. In: *SPIE Proceedings* 1881 (1993), S. 116–125
- [138] MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of Immunological Methods* 65 (1983), S. 55–63

- [139] NAGAMITSU, A. ; GREISH, K. ; MAEDA, H.: Elevating Blood Pressure as a Strategy to Increase Tumor-targeted Delivery of Macromolecular Drug SMANCS: Cases of Advanced Solid Tumors. In: *Japanese Journal of Clinical Oncology* 39 (2009), S. 756–766
- [140] NICOTERA, P. ; LEIST, M. ; FERRANDO-MAY, E.: Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. In: *Toxicology Letters* 102-103 (1998), S. 139 – 142
- [141] NIEDRE, M. ; PATTERSON, M. S. ; WILSON, B. C.: Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells and tissues *in vivo*. In: *Photochemistry and Photobiology* 75 (2002), S. 382–391
- [142] NILSSON, C. ; JOHANSSON, U. ; JOHANSSON, A.-C. ; KAGEDAL, K. ; ÖLLINGER, K.: Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF- α induced apoptosis in U937 cells. In: *Apoptosis* 11(7) (2006), S. 1149–1159
- [143] NUTTENS, V.E. ; WÉRA, A.-C. ; BOUCHAT, V. ; LUCAS, S.: Determination of biological vector characteristics and nanoparticle dimensions for radioimmunotherapy with radioactive nanoparticles. In: *Applied Radiation and Isotopes* 66 (2008), S. 168 – 172
- [144] OBERDANNER, C. B. ; KIESSLICH, T. ; KRAMMER, B. ; PLAETZER, K.: Glucose is Required to Maintain High ATP-levels for the Energy-utilizing Steps During PDT-induced Apoptosis. In: *Photochemistry and Photobiology* 76(6) (2002), S. 695–703
- [145] OBERDANNER, C. B. ; PLAETZER, K. ; KIESSLICH, T. ; KRAMMER, B.: Photodynamic Treatment with Fractionated Light Decreases Production of Reactive Oxygen Species and Cytotoxicity In Vitro via Regeneration of Glutathione. In: *Photochemistry and Photobiology* 81 (2005), S. 609–613
- [146] OELCKERS, S. ; ZIEGLER, T. ; MICHLER, I. ; RÖDER, B.: Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red-cell ghost suspensions: concerning a signal component that can be attributed to $^{1}O_2$ luminescence from the inside of a native membrane. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 53 (1999), S. 121–127
- [147] OLEINICK, N. L. ; MORRIS, R. L. ; BELICHENKO, I.: The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. In: *Photochemical and Photobiological Sciences* 1 (2002), S. 1–21
- [148] PALMER, T.N. ; CARIDE, V. J. ; CALDECOURT, M. A. ; TWICKLER, J. ; ABDULLAH, V.: The mechanism of liposome accumulation in infarction. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 797 (1984), S. 363 – 368

- [149] PANYAM, J. ; LABHASETWAR, V.: Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (2003), S. 329 – 347
- [150] PAUL, A. ; HACKBARTH, S. ; MÖLICH, A. ; LUBAN, C. ; OELCKERS, S. ; BÖHM, F. ; RÖDER, B.: Comparative Study of the Photosensitization of Jurkat Cells in vitro by Pheophorbide-a and a Pheophorbide-a Diaminobutane Poly-Propylene-Imine Dendrimer Complex. In: *Laser Physics* Vol. 13 (2003), S. 22–29
- [151] PAUL, A. ; HACKBARTH, S. ; VOGT, R. D. ; RÖDER, B. ; BURNISON, B. K. ; STEINBERG, C. E. W.: Photogeneration of singlet oxygen by humic substances: comparison of humic substances of aquatic and terrestrial origin. In: *The Royal Society of Chemistry and Owner Societies* 3 (2004), S. 273–290
- [152] PAUL, A. ; MÖLICH, A. ; OELCKERS, S. ; SEIFERT, M. ; RÖDER, B.: Alkyl-substituted magnesium phthalocyanine: photo-toxicity after excitation of higher electronic states in cells in vitro. In: *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 6 (2002), S. 340–346
- [153] PERRAULT, S. D. ; WALKEY, C. ; JENNINGS, T. ; FISCHER, H. C. ; CHAN, W. C. W.: Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. In: *Nano Letters* 9(5) (2009), S. 1909–1915
- [154] PETERS, T.: Serum albumin. In: *Advances in Protein Chemistry* 37 (1985), S. 161–245
- [155] *Kapitel* Historical perspective. In: PETERS, T. ; HASSAN, M. ; AZZAZY, E. ; CHRISTENSON, Robert H.: *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Application*. Academic Press, San Diego, 1996, S. 432–440
- [156] PLAETZER, K. ; KIESSLICH, T. ; KRAMMER, B. ; HAMMERL, P.: Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT. In: *Photochemical and Photobiological Sciences* 1 (2002), S. 172–177
- [157] PLAETZER, K. ; KIESSLICH, T. ; OBERDANNER, C. B. ; KRAMMER, B.: Apoptosis Following Photodynamic Tumor Therapy: Induction, Mechanisms and Detection. In: *Current Pharmaceutical Design* 11 (2005), S. 1151–1165
- [158] PLAETZER, K. ; KIESSLICH, T. ; VERWANGER, T. ; KRAMMER, B.: The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. In: *Medical Laser Application* 18 (2003), S. 7 – 19
- [159] PLAETZER, K. ; KRAMMER, B. ; BERLANDA, J. ; BERR, F. ; KIESSLICH, T.: Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. In: *Lasers in Medical Science* 24(2) (2009), S. 259–268

- [160] POHL, J.: *Zelluläre Aufnahme und Phototoxizität von Polymer-mTHPC Nanopartikeln*, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Physik, AG Photobiophysik, Bachelorarbeit, 2009
- [161] PREUSS, A.: *Untersuchung von HSA-Nanopartikeln als Transportsysteme für Wirkstoffe der Photodynamischen Therapie*, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Physik, AG Photobiophysik, Diplomarbeit, 2007
- [162] PREUSS, A. ; CHEN, K. ; HACKBARTH, S. ; WACKER, M. ; LANGER, K. ; RÖDER, B.: *Photosensitizer loaded HSA nanoparticles II: In vitro investigations*. 2010
- [163] RAAB, O.: Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. In: *Zellbiologie* 39 (1900), S. 524–546
- [164] RANCAN, F. ; HELMREICH, M. ; MOELICH, A. ; JUX, N. ; HIRSCH, A. ; ROEDER, B. ; WITTE, C. ; BOEHM, F.: Fullerene-pyropheophorbide a complexes as sensitizer for photodynamic therapy: Uptake and photo-induced cytotoxicity on Jurkat cells. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 80 (2005), S. 1–7
- [165] RANCAN, F. ; WIEHE, A. ; NOEBEL, M. ; SENGE, M. O. ; OMARI, S. A. ; BOEHM, F. ; JOHN, M. ; ROEDER, B.: Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 78 (2005), S. 17–28
- [166] RÖDER, B.: *Einführung in die molekulare Photobiophysik*. Teubner Studienbücher, 1999
- [167] In: RÖDER, B.: *Photodynamic therapy*, in *Encyclopedia Analytical Chemistry*. John Wiley & sons Ltd., Chichester., 2000, S. 302–320
- [168] RÖDER, B. ; NICKLISCH, S. ; WISCHNEWSKY, G. ; SLAWATICKI, E. ; MEFFERT, H.: Mittel zur Behandlung von Hauterkrankungen und Tumoren. In: *Patent 08.October 1984* WP (1984), S. 248 282
- [169] RÖDER, B. ; NÄTHER, D. ; LEWALD, T. ; BRAUNE, M. ; FREYER, W. ; NOWAK, Ch.: Photophysical properties and photodynamic activity in vivo of some tetrapyrroles. In: *Biophysical Chemistry* 35 (1990), S. 303–312 (invited paper)
- [170] REDMOND, R. W. ; GAMLIN, J. N.: A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. In: *Photochemistry and Photobiology* 70(4) (1999), S. 391–475
- [171] REGEHLY, M.: *Photoinduced transfer processes in complex carrier systems for photodynamic therapy*, Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Physik, AG Photobiophysik, Doktorarbeit, 2008

- [172] REGEHLY, M. ; ERMILOV, E. A. ; HELMREICH, M. ; HIRSCH, A. ; JUX, N. ; ROEDER, B.: Photoinduced Energy and Electron Transfer Processes in Hexapyropheophorbide a-Fullerene [C60] Molecular Systems. In: *Journal of Physical Chemistry B* 111 (2007), S. 998–1006
- [173] REGEHLY, M. ; GREISH, K. ; RANCAN, F. ; MAEDA, H. ; BOEHM, F. ; ROEDER, B.: Water-Soluble Polymer Conjugates of ZnPP for Photodynamic Tumor Therapy. In: *Bioconjugate Chemistry* 18 (2007), S. 494–499
- [174] REITER, I. ; KRAMMER, B. ; SCHWAMBERGER, G.: Cutting Edge: Differential Effect of Apoptotic Versus Necrotic Tumor Cells on Macrophage Antitumor Activities. In: *Journal of Immunology* 163 (1999), S. 1730–1732
- [175] RHODES, L. E. ; RIE, M. de ; ENSTROM, Y. ; GROVES, R. ; MORKEN, T. ; GOULDEN, V. ; WONG, G. A. E. ; GROB, J.-J. ; VARMA, S. ; WOLF, P.: Photodynamic Therapy Using Topical Methyl Aminolevulinate vs Surgery for Nodular Basal Cell Carcinoma: Results of a Multicenter Randomized Prospective Trial. In: *Archives of Dermatology* 140 (2004), S. 17–23
- [176] ROBERTS, W. G. ; PALADE, G. E.: Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. In: *Cancer Research* 57 (1997), S. 765–772
- [177] ROBERTSON, C. A. ; EVANS, D. H. ; ABRAHAMSE, H.: Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 96 (2009), S. 1 – 8
- [178] RODGERS, M. A. J.: Reflections on type I photodynamic damage. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 18 (1993), S. 296 – 298
- [179] ROEDER, B. ; ERMILOV, E. A. ; HACKBARTH, S. ; HELMREICH, M. ; JUX, N.: Trap formation and energy transfer in pheophorbide a -DAB-dendrimers and pyropheophorbide a - fullerene C60 hexaadduct molecular systems. In: *SPIE Proceedings* 6192 (2006), S. 495–507
- [180] ROEDER, B. ; HACKBARTH, S. ; WIEHE, A. ; RANCAN, F. ; JUX, N. ; A. HIRSCH, M. H. ; ERMILOV, E. ; SENGE, M. O. ; NOEBEL, M. ; OMARI, S. A. ; SIMONENKO, K.: Influence of tetra pyrrole amphiphilicity on membrane localization and the mechanism of photosensitized cell death. In: *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 8 (2004), S. 472
- [181] ROSENBLUTH, M. J. ; LAM, W. A. ; FLETCHER, D. A.: Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. In: *Biophysical Journal* 90(8) (2006), S. 2994–3003
- [182] ROTOMSKIS, R. ; MICKUNAITIS, V. ; JUODZEVICIUS, D. ; PISKARSKAS, A. S.: Two-step excitation in photosensitized tumor therapy. In: *SPIE Proceedings* 2325 (1995), S. 347–355

- [183] SAHAY, G. ; ALAKHOVA, D. Y. ; KABANOV, A. V.: Endocytosis of nanomedicines. In: *Journal of Controlled Release* 145 (2010), S. 182 – 195
- [184] SALOMON, D. S. ; BRANDT, R. ; CIARDIELLO, F. ; NORMANNO, N.: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 19(3) (1995), S. 183 – 232
- [185] SASNOUSKI, S. ; ZORIN, V. ; KHLUDEYEV, I. ; D'HALLEWIN, M.-A. ; GUILLEMIN, F. ; BEZDETNAYA, L.: Investigation of Foscan interactions with plasma proteins. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1725 (2005), S. 394–402
- [186] SAVILL, J. ; DRANSFIELD, I. ; HOGG, N. ; HASLETT, C.: Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. In: *Nature* 343(6254) (1990), S. 170–3
- [187] SCHAKENRAAD, J. M. ; HARDONK, M. J. ; FEIJEN, J. ; MOLENAAR, I. ; NIEUWENHUIS, P.: Enzymatic activity toward poly(l-lactic acid) implants. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 24 (1990), S. 529–545
- [188] SCHLOTHAUER, J. ; HACKBARTH, S. ; RÖDER, B.: A new benchmark for time-resolved detection of singlet oxygen luminescence - revealing the evolution of lifetime in living cells with low dose illumination. In: *Laser Physics Letters* 6(3) (2008), S. 216 – 221
- [189] SCHWARTZ, L. M. ; OSBORNE, B. A.: Programmed cell death, apoptosis and killer genes. In: *Immunology Today* 14(12) (1993), S. 582–590
- [190] SCHWARTZ, S. K. ; ABSOLON, K. ; VERMUND, H.: Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours. In: *University of Minnesota Medical Bulletin* 27 (1955), S. 7–8
- [191] SEBASTIAN, S. ; SETTLEMAN, J. ; RESHKIN, S. J. ; AZZARITI, A. ; BELLIZZI, A. ; PARADISO, A.: The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: From expression to turnover. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1766 (2006), S. 120 – 139
- [192] SHI, Y.: Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. In: *Molecular Cell* 9 (2002), S. 459–70
- [193] SHI, Y.: Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. In: *Protein Science* 13(8) (2004), S. 1979 – 1987
- [194] SHIVE, M. S. ; ANDERSON, J. M.: Biodegradation next and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 28 (1997), S. 5–24
- [195] SHUBAYEV, V. I. ; PISANIC, T. R. ; JIN, S.: Magnetic nanoparticles for theragnostics. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009), S. 467–477

- [196] SINGH, R. ; LILLARD, J. W.: Nanoparticle-based targeted drug delivery. In: *Experimental and Molecular Pathology* 86 (2009), S. 215 – 223. – Special Issue: Structural Biology
- [197] SJOBLÖM, T. ; JONES, S. ; WOOD, L. D. ; PARSONS, D. W. ; LIN, J. ; BARBER, T. D. ; MANDELKER, D. ; LEARY, R. J. ; PTAK, J. ; SILLIMAN, N. ; SZABO, S. ; BUCKHAULTS, P. ; FARRELL, C. ; MEEH, P. ; MARKOWITZ, S. D. ; WILLIS, J. ; DAWSON, D. ; WILLSON, J. K. ; GAZDAR, A. F. ; HARTIGAN, J. ; WU, L. ; LIU, C. ; PARMIGIANI, G. ; PARK, B. H. ; BACHMAN, K. E. ; PAPADOPOULOS, N. ; VOGELSTEIN, B. ; KINZLER, K. W. ; VELCULESCU, V. E.: The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. In: *Science* 314 (2006), S. 268–274
- [198] SKYRME, R. J. ; FRENCH, A. J. ; DATTA, S. N. ; ALLMAN, R. ; MASON, M. D. ; MATTHEWS, P. N.: A phase-1 study of sequential mitomycin C and 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in recurrent superficial bladder carcinoma. In: *BJU International* 95 (2005), S. 1206–1210
- [199] SLEDGE, G. W. ; MILLER, K. D.: Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer. In: *European Journal of Cancer* 39 (2003), S. 1668 – 1675
- [200] SLOWING, I. I. ; VIVERO-ESCOTO, J. L. ; WU, C.-W. ; LIN, V. S.-Y.: Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008), S. 1278–1288
- [201] SPENLEHAUER, G. ; VERT, M. ; BENOIT, J. P. ; BODDAERT, A.: In vitro and In vivo degradation of poly(D,L lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. In: *Biomaterials* 10 (1989), S. 557 – 563
- [202] SPILLER, W. ; WÖHRLE, H. ; KLIESCHAND D. ; HACKBARTH, S. ; RÖDER, B. ; SCHNURPFEL, G.: Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. In: *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 2 (1998), S. 145–158
- [203] SUN, C. ; LEE, J. S. H. ; ZHANG, M.: Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008), S. 1252–1265
- [204] SUN, Y. ; CHEN, Z. I. ; YANG, X. ; HUANG, P. ; ZHOU, X. ; DU, X.: Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy. In: *Nanotechnology* 20 (2009), S. 135102
- [205] TAMIETTI, B. F. P. ; MACHADO, A. H. A. ; MAFTOUM-COSTA, M. ; SILVA, N. S. D. ; TEDESCO, A. C. ; PACHECO-SOARES, C.: Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with ALPCS(4). In: *Photomedicine and Laser Surgery* 25 (2007), S. 175–179

- [206] TANAKA, T. ; SHIRAMOTO, S. ; MIYASHITA, M. ; Y. FUJISHIMA, Y. K.: Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). In: *International Journal of Pharmaceutics* 277 (2004), S. 39–61
- [207] TAPPEINER, H. V. ; JODLBAUER, A.: Über Wirkung der photodynamischen fluoreszierenden Stoffe auf Protozoen und Enzyme. In: *Deutsches Archiv für klinische Medizin* 80 (1904), S. 427–487
- [208] TEICHER, B. A.: Molecular targets and cancer therapeutics: discovery, development and clinical validation. In: *Drug Resistance Updates* 3 (2000), S. 67 – 73
- [209] THIRUGANESH, R. ; DEVI, S. K. U.: Solid lipid nanoparticle and nanoparticle lipid carrier for controlled drug delivery - a review of state of art and recent advances. In: *International Journal of Nanoparticles* 3 (1) (2010), S. 32 – 52
- [210] THORNBERRY, N. A. ; LAZEBNIK, Y.: Caspases: Enemies Within. In: *Science* 281 (1998), S. 1312–1316
- [211] TORCHILIN, V.: Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* In Press, Corrected Proof (2010), S. –
- [212] TORCHILIN, V. P. ; KLIBANOV, A. L. ; HUANG, L. ; O'DONNELL, S. ; NOSSIFF, N. D. ; KHAW, B. A.: Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. In: *FASEB Journal* 6 (1992), S. 2716–2719
- [213] TRIESSCHEIJN, M. ; BAAS, P. ; SCHELLENS, J. H. M. ; STEWART, F. A.: Photodynamic Therapy in Oncology. In: *The Oncologist* 11 (2006), S. 1034–1044
- [214] TSUNODA, S. P. ; HEGEMANN, P.: Glu 87 of channelrhodopsin-1 causes pH-dependent color tuning and fast photocurrent inactivation. In: *Photochemistry and Photobiology* 85 (2009), S. 564–569
- [215] VASEY, P.A. ; KAYE, S.B. ; MORRISONA, R. ; TWELVES, C. ; WILSON, P. ; DUNCAN, R. ; THOMSON, A.H. ; MURRAY, L.S. ; HILDITCH, T.E. ; MURRAY, T. ; BURTLES, S. ; D. FRAIER, E. F. ; CASSIDY, J.: Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 (HPMA copolymer doxorubicin): first member of a new class of chemotherapeutic agents-drugpolymer conjugates. In: *Clinical Cancer Research* 5 (1999), S. 83–94
- [216] VEISEH, O. ; GUNN, J. W. ; ZHANG, M.: Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 62 (2010), S. 284 – 304. – Targeted Delivery Using Inorganic Nanosystem
- [217] VENKATESAN, P. ; DAS, S. ; KRISHNAN, M. Muthu R. ; CHAKRABORTY, C. ; CHAUDHURY, K. ; MANDAL, M.: Effect of AEE788 and/or Celecoxib on colon cancer cell morphology using advanced microscopic techniques. In: *Micron* 41 (2010), S. 247 – 256

- [218] VILLA, P. ; KAUFMANN, S. H. ; EARNSHAW, W. C.: Caspases and caspase inhibitors. In: *Trends Biochemical Science* 22 (1997), S. 388–393
- [219] VOLL, R. E. ; HERRMANN, M. ; ROTH, E. A. ; STACH, C. ; KALDEN, J. R. ; GIRKONTAITE, I.: Immunosuppressive effects of apoptotic cells. In: *Nature* 390 (1997), S. 350–351. – ISSN 0028–0836
- [220] WACKER, M.: *Entwicklung Albumin-basierter, nanopartikulärer Arzneistoffträger-systeme für die Photodynamische Therapie*, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie, Dissertation, 2010
- [221] WACKER, M. ; CHEN, K. ; PREUSS, A. ; POSSEMEYER, K. ; RÖDER, B. ; LANGER, K.: Photosensitizer loaded HSA nanoparticles I: Preparation and photophysical properties. In: *International Journal of Pharmaceutics* 393 (2010), S. 254–263
- [222] WALKER, N. L. ; HARMON, B. V. ; GOBÉ, G. C. ; KERR, J. F.: Patterns of cell death. In: *Methods Archiv of Experimental and Molecular Pathology*. 13 (1988), S. 18–54
- [223] WEBER, C. ; KREUTER, J. ; LANGER, K.: Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. In: *International Journal of Pharmaceutics* 211 (2000), S. 67–78
- [224] WESSELS, J. M. ; FOOTE, C. S. ; FORD, W. E. ; RODGERS, M. A. J.: Photooxidation of Tryptophan: $O_2(1\Delta g)$ versus Electron-Transfer Pathway. In: *Photochemistry and Photobiology* 65 (1997), S. 96–102
- [225] WILLINGHAM, M. C. ; PASTAN, I.: Endocytosis and exocytosis: current concepts of vesicle traffic in animal cells. In: *International Review of Cytology* 92 (1984), S. 51–92
- [226] WILSON, B. C. ; JEEVES, W. P. ; LOWE, D. M.: In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. In: *Photochemistry and Photobiology* 42 (1985), S. 153–162
- [227] WOJTYK, J. T. ; GOYAN, R. ; GUDGIN-DICKSON, E. ; POTTIER, R.: Exploiting tumour biology to develop novel drug delivery strategies for PDT. In: *Medical Laser Application* 21 (2006), S. 225 – 238
- [228] WOOD, L. D. ; PARSONS, D. W. ; JONES, S. ; LIN, J. ; SJOBLUM, T. ; LEARY, R. J. ; SHEN, D. ; BOCA, S. M. ; BARBER, T. ; PTAK, J. ; SILLIMAN, N. ; SZABO, S. ; DEZSO, Z. ; USTYANKSKY, V. ; NIKOLSKAYA, T. ; NIKOLSKY, Y. ; KARCHIN, R. ; WILSON, P. A. ; KAMINKER, J. S. ; ZHANG, Z. ; CROSHAW, R. ; WILLIS, J. ; DAWSON, D. ; SHIPITSIN, M. ; WILLSON, J. K. V. ; SUKUMAR, S. ; POLYAK, K. ; PARK, B. H. ; PETHIYAGODA, C. L. ; PANT, P. V. K. ; BALLINGER, D. G. ; SPARKS, A. B. ; HARTIGAN, J. ; SMITH, D. R. ; SUH, E. ; PAPADOPOULOS, N.

- ; BUCKHAULTS, P. ; MARKOWITZ, S. D. ; PARMIGIANI, G. ; KINZLER, K. W. ; VELCULESCU, V. E. ; VOGELSTEIN, B.: The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. In: *Science* 318 (2007), S. 1108–1113
- [229] WU, A. M. ; CHEN, W. ; RAUBITSCHKE, A. ; WILLIAMS, L. E. ; NEUMAIER, M. ; FISCHER, R. ; HU, S. Z. ; ODOM-MARYON, T. ; WONG, J. Y. ; SHIVELY, J. E.: Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. In: *Immunotechnology* 2 (1996), S. 21–36
- [230] WYLLIE, A. H.: What is apoptosis? In: *Histopathology* 10(9) (1986), S. 995–998
- [231] YANG, P.-H. ; SUN, X. ; CHIU, J.-F. ; SUN, H. ; HE, Q.-Y.: Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. In: *Bioconjugate Chemistry* 16 (2005), S. 494–496
- [232] YUAN, F.: Transvascular drug delivery in solid tumors. In: *Seminars in Radiation Oncology* 8 (1998), S. 164 – 175. – Tumor Physiology and Metastases
- [233] YUAN, F. ; CHEN, Y. ; DELLIAN, M. ; SAFABAKHSH, N. ; FERRARA, N. ; JAIN, R. K.: Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), S. 14765–14770
- [234] YUAN, F. ; DELLIAN, M. ; FUKUMURA, D. ; LEUNIG, M. ; BERK, D. A. ; TORCHILIN, V. P. ; JAIN, R. K.: Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. In: *Cancer Research* 55 (1995), S. 3752–3756
- [235] YUAN, Q. ; SHAH, J. ; HEIN, S. ; MISRA, R. D. K.: Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. In: *Acta Biomaterialia* 6 (2010), S. 1140 – 1148

Abbildungsverzeichnis

1.1	Diagnostisches Fenster - Absorptionsspektren der häufigsten Pigmente in humanem Gewebe.	6
1.2	Jablonski-Diagramm für das System Photosensibilisator/ Sauerstoff. . . .	9
1.3	Schematische Darstellung des Ablaufs der Zelltodmechanismen Apoptose und Nekrose	10
1.4	Signalwege der Apoptose und Nekrose	12
1.5	Der EPR-Effekt	14
3.1	Fluoreszenzmessplatz	23
3.2	Messplatz der Laserflashphotolyse	25
3.3	Laserflashphotolyse-Messkurve	25
3.4	Messplatz für zeitaufgelöste 1O_2 -Lumineszenzmessung	26
3.5	Wirkungsspektrum der Weißlichtdioden der Bestrahlungseinheit	31
3.6	Alte Bestrahlungsapparatur mit monochromer Laserdiode als Lichtquelle .	31
3.7	Lebende, apoptotische und nekrotische Jurkatzellen nach Trypanblau-Färbung unter dem Lichtmikroskop	32
3.8	Vergleich der Zählmethode mit dem Caspase 3/7-Assay zur Bestimmung der Phototoxizität	33
4.1	Strukturformeln der verwendeten PS	35
4.2	Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren der PS	37
4.3	Intrazelluläre Aufnahme der Photosensibilisatoren	39
4.4	Dunkeltoxizität von Pheo, mTHPP und mTHPC in Jurkatzellen	40
4.5	Phototoxizität von Pheo, mTHPP und mTHPC in Jurkatzellen	41
5.1	Intrazelluläre Aufnahme von PHSA40 und PHSA100	48
5.2	CLSM -PHSA40 und PHSA100 in Jurkatzellen	51
5.3	FLIM -PHSA40 und PHSA100 in Jurkatzellen	52
5.4	Dunkeltoxizität von PHSA40, PHSA100, HSA40, HSA100 in Jurkatzellen	53
5.5	Phototoxizität von PHSA40 und PHSA100 in Jurkatzellen	54
6.1	Intrazelluläre Aufnahme von mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(2,00)	60
6.2	Dunkeltoxizität von mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(0,75) in Jurkatzellen	61
6.3	Phototoxizität von mTHPP-HSA(0,75) und mTHPP-HSA(0,75) in Jurkatzellen	62
6.4	Intrazelluläre Aufnahme von mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200	63

6.5	Dunkeltoxizität von mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 in Jurkatzellen	64
6.6	Phototoxizität mTHPC-HSA40, mTHPC-HSA100 und mTHPC-HSA200 in Jurkatzellen	65
6.7	Dunkeltoxizität von 18mTHPC-HSA100 und 31mTHPC-HSA100 in Jurkatzellen	66
6.8	Phototoxizität von 18mTHPC-HSA100 und 31mTHPC-HSA100 in Jurkatzellen	67
6.9	CLSM -mTHPP-HSA in Jurkatzellen	68
6.10	CLSM -mTHPC in Jurkatzellen	70
6.11	CLSM -mTHPC-HSA100 in Jurkatzellen	71
6.12	FLIM -mTHPP-HSA100 in Jurkatzellen	73
6.13	FLIM - mTHPC und mTHPC-HSA in Jurkatzellen	75
7.1	Intrazelluläre Aufnahme von mTHPP-PLGA	84
7.2	CLSM -mTHPC beladene PLGA-Nanopartikel	85
7.3	FLIM -mTHPP-PLGA in Jurkatzellen	87
7.4	Dunkeltoxizität von mTHPP-PLGA und PLGA in Jurkatzellen	88
7.5	Phototoxizität von mTHPP-PLGA und PLGA in Jurkatzellen	88
7.6	Aufnahme von mTHPC-PLGA ^{ia} , mTHPC-PLGA ⁱ und mTHPC-PLGA ^a in Jurkatzellen	90
7.7	Dunkeltoxizität von mTHPC-PLGA ^{ia} , mTHPC-PLGA ⁱ und mTHPC-PLGA ^a in Jurkatzellen	91
7.8	Phototoxizität von mTHPC-PLGA ^{ia} , mTHPC-PLGA ⁱ und mTHPC-PLGA ^a in Jurkatzellen	92
7.9	Aufnahme von mTHPC-PLGA, mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-PEG in Jurkatzellen	94
7.10	Intrazelluläre Aufnahme von mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-PEG, in HT29-Zellen	95
7.11	CLSM -mTHPC-PLGA ⁱ in Jurkatzellen	97
7.12	CLSM -mTHPC-PLGA-IgG in Jurkatzellen	99
7.13	CLSM -mTHPC-PLGA-Erb in Jurkatzellen	100
7.14	FLIM -mTHPP-PLGA, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-Erb in Jurkatzellen	102
7.15	Dunkeltoxizität von AmTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG, mTHPC-PLGA-PEG in Jurkatzellen	103
7.16	Phototoxizität von mTHPC-PLGA-Erb, mTHPC-PLGA-IgG und mTHPC-PLGA-PEG in Jurkatzellen	104
7.17	Phototoxizität von mTHPC, mTHPC-PLGA ^a und modifizierten mTHPC-PLGA-NP in HT29-Zellen, Caspase 3/7-Assay	105

Tabellenverzeichnis

2.1	Nährmedium für Jurkatzellen	20
2.2	DMEM	20
2.3	Sterile Puffer, Lösungen und Assays für die Zellkultur	20
2.4	Laborgeräte und sonstiges Arbeitsmaterial	21
2.5	Material in der Absorptions- und in der Fluoreszenzspektroskopie	22
2.6	Material für CLSM und FLIM	22
3.1	λ_{ex} für die zeitaufgelöste 1O_2 -Luminiszenz-Detektion in Zellsuspensionen abhängig vom untersuchten PS	26
4.1	Eigenschaften der verwendeten PS	36
4.2	Übersicht über die Ergebnisse der <i>in vitro</i> Voruntersuchungen an den Photosensibilisatoren Pheo, mTHPP und mTHPC in Jurkatzellen	42
4.3	Liste der untersuchten HSA-NP	44
4.4	Liste der untersuchten unmodifizierten PLGA-NP	45
4.5	Liste der untersuchten modifizierten PLGA-NP	45
8.1	Übersicht über die Ergebnisse der <i>in vitro</i> Untersuchungen an den Photo- sensibilisator-beladenen HSA-Nanopartikeln	117
8.2	Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchungen an den Photosensibili- sator-beladenen PLGA-Nanopartikeln	118
3	Photophysikalische Parameter	119
4	Übersicht der photophysikalischen Untersuchungen an Pheo-HSA-Nano- partikel	121
5	Übersicht der photophysikalischen Untersuchungen an mTHPP-HSA100- Nanopartikeln	122
6	Übersicht der photophysikalischen Untersuchungen an mTHPC-HSA- Nanopartikeln	123
7	Fluoreszenzlebensdauer von mTHPP-PLGA- und mTHPC-PLGA-Nano- partikeln	124
8	Triplettlebensdauer von mTHPP-PLGA-Nanopartikeln <i>in vitro</i>	126
9	Photophysikalische Messungen an AK-modifizierten mTHPC-PLGA-Na- nopartikeln	127

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 12. Januar 2012

Annegret Preuß